



Valorisation des xylanes du bois : vers la synthèse de copolymères amphiphiles bio-sourcés

Maud Chemin

► To cite this version:

Maud Chemin. Valorisation des xylanes du bois : vers la synthèse de copolymères amphiphiles bio-sourcés. Polymères. Université de Bordeaux, 2014. Français. <NNT : 2014BORD0302>. <tel-01152890>

HAL Id: tel-01152890

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01152890>

Submitted on 18 May 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ de BORDEAUX

École Doctorale des Sciences Chimiques

Spécialité : POLYMÈRES

Par **Maud CHEMIN**

Valorisation des xylanes du bois
Vers la synthèse de copolymères amphiphiles bio-sourcés

Sous la direction des Prs Henri Cramail
et Stéphane Grelier

Soutenue le : 19 décembre 2014

Devant la commission d'examen formée de :

Sébastien Lecommandoux	Professeur à Université de Bordeaux	Examineur
Carlos Pascoal Neto	Professeur à Universidade de Aveiro	Rapporteur
Alain Durand	Professeur à Université de Lorraine	Rapporteur
Guillaume Chollet	Responsable Projets Lipochimie - ITERG	Examineur
Denilson Da Silva Perez	Chef de projets Expert - FCBA	Examineur
Stéphane Grelier	Professeur à Université de Bordeaux	Directeur de thèse
Henri Cramail	Professeur à Université de Bordeaux	Directeur de thèse

*‘Science sans conscience n’est que ruïne de
l’âme’.*

F. Rabelais

Remerciements

C'est avec émotion que je profite de ces quelques lignes pour remercier toutes les personnes qui ont, de près ou de loin, contribué à la bonne réalisation de mon projet de thèse.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Henri Cramail, Professeur à l'Université de Bordeaux, qui a dirigé cette étude pour m'avoir fait confiance et permis de rejoindre son équipe au sein du Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques.

Je tiens à remercier Stéphane Grelier, Professeur à l'Université de Bordeaux, pour ses qualités humaines et sa confiance réconfortante. Ses qualités scientifiques, ainsi que ses conseils avisés m'ont permis de réaliser ce projet dans des conditions tout à fait idéales.

Comment ne pas remercier Dr Frédérique Ham-Pichavant, mon encadrante de proximité. Son implication dans mon projet de thèse m'a été très bénéfique, me permettant d'apprendre énormément d'un point de vue scientifique. L'intérêt qu'elle a manifesté à l'égard de cette étude ainsi que ses conseils avisés ont été un réel soutien.

Je suis très reconnaissante envers les Prs Neto et Durand d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi qu'envers les Pr Lecommandoux et Drs Chollet et Da Silva Perez d'avoir accepté d'examiner ce travail. Je les remercie pour leurs remarques constructives vis à vis du manuscrit et pour la discussion fructueuse qui a suivi ma soutenance.

Cette étude a été réalisée dans le cadre d'un projet co-financé par le FCBA (institut technologique Forêt Cellulose Bois-construction Ameublement) et par l'ITERG (centre technique industriel des huiles et des corps gras). La collaboration autour de ce projet a été un réel plaisir et je tiens à remercier Frédéric Staat et Michel Petit-Conil pour le FCBA ainsi que Guillaume Chantre et Carine Alfos pour l'ITERG, qui m'ont donné l'opportunité de travailler dans le cadre de ce projet de thèse multipartenaires.

Je remercie aussi les Drs Benoit Gadenne, Guillaume Chollet de l'ITERG pour leur intérêt et leur encadrement dans ce projet. Je remercie plus particulièrement le Dr Denilson da Silva Perez du FCBA qui a apporté une aide particulière pour toute la partie 'xylane'. Merci Denilson pour ton

soutien, ton encadrement et tes corrections de publications mais surtout pour tes remarques positives ; pour ne pas dire compliments ; qui arrivaient toujours au bon moment pour me redonner un coup de pouce.

J'ai également une pensée toute particulière pour les stagiaires IUT, Licences, Masters ou Ingénieurs qui ont participé à cette étude et en particulier Alex et Jérémie pour leur enthousiasme et leur bonne humeur.

Je tiens également à exprimer ma sympathie et mes remerciements à l'ensemble du personnel 'technique' permanent du LCPO - Nico, Gégé, Cédric, Manu, Catherine, Corinne, Bernadette, Amélie, et Loic - et tout particulièrement à Anne-Laure et Eric qui ont consacré beaucoup de temps et d'énergie à ma formation sur les techniques de caractérisations en spectroscopie et chromatographie.

Un grand merci également à tous les (ex-)doctorants, post-docs et stagiaires rencontrés et appréciés au LCPO (Thomas, Lise, Arvind, Jules, Paul, Winnie, Maréva, Antoine, Bertrand, Audrey, Estelle, Blandine, Kévin, Jérémy, Elise, Samira, Colin, Romain, Julie, Cédric, Silvia, Charlotte, Camille, Geoffrey, Océane, Aurélien, Thibault, Maité, Floraine, Prakash, Mickaël, Romain, Carine, Valentina, Daniela, Loïc, Edgar, Marie, An, Jérémie, Benji et bien d'autres encore...). Un clin d'œil tout particulier à Alex, Vincent et Olivia, mes acolytes du rez-de-chaussée, avec qui ces 3 années de thèse furent pleines de bons moments.

Enfin j'aimerais adresser mes remerciements à plusieurs personnes croisées au cours de ma formation pour m'avoir inspiré et donner le goût des polymères:

- Pr Alain Soum
- Dr Valérie Ravaine
- Dr Martin Bosma
- Pr Sébastien Lecommandoux, Pr Eric Papon, Dr Véronique Coma, Dr Valérie Héroguez, Dr Christophe Schatz, Dr Gilles Sèbe et bien d'autres encore...

Je remercie aussi toute ma famille, mes amis et particulièrement Thomas pour son soutien et sa patience. Et merci à mes chefs de m'avoir donné l'opportunité de participer à de nombreuses conférences et plus particulièrement à l'ISGC-2 puisque durant ma visite de l'aquarium La Rochelle j'ai rencontré l'homme qui partage maintenant ma vie.

Valorisation des xylanes du bois : vers la synthèse de copolymères amphiphiles bio-sourcés

Résumé

La thèse présentée propose une nouvelle voie de valorisation des xylanes du bois par l'élaboration de nouveaux polymères bio-sourcés et amphiphiles.

Après une caractérisation complète de xylanes issus du bois de hêtre, l'hydrolyse acide en milieu dilué a été optimisée afin d'obtenir des xylo-oligosaccharides d'environ 6 unités xylose par chaîne avec une seule unité acide méthylglucuronique positionnée à l'extrémité non réductrice de la chaîne. En parallèle, l'étude de l'oxydation au periodate de sodium de ces xylanes a été effectuée pour permettre l'introduction d'un nombre contrôlé de fonctions aldéhyde le long de la chaîne. La fonction aldéhyde de l'extrémité réductrice des oligomères de xylane a ensuite été fonctionnalisée par un groupement allyle ou azoture pour permettre leur couplage à des dérivés d'acide gras par 'chimie click'.

Les oligomères amphiphiles ainsi obtenus ont ensuite été étudiés pour leurs propriétés tensioactives et d'auto-assemblage. Ils présentent de bonnes propriétés de mouillage, comparables à celles du Tween®80. Les objets issus de l'auto-assemblage de ces oligomères amphiphiles ont été analysés par DLS et TEM. Ils s'auto-assemblent aussi bien dans le chloroforme que dans l'eau. Les objets formés sont sphériques et de taille micellaire ($d \leq 50$ nm). Ces objets ont tendance à s'associer pour former des agrégats, surtout dans le chloroforme. Ces agrégats sont régis par des interactions assez faibles pour être éliminés par dilution. Ils peuvent également être éliminés par simple filtration.

Finalement, ce travail de thèse aura abouti à la synthèse de composés amphiphiles totalement bio-sourcés, à partir de xylanes, coproduits potentiels de l'industrie papetière. Grâce à leurs propriétés tensioactives, les applications envisageables pour ces tensioactifs 'verts' sont nombreuses. De plus, leur caractère biocompatible et leur auto-assemblage en solution aqueuse en font de bons candidats pour l'encapsulation et la vectorisation de principes actifs.

Mots clés

amination réductrice ; amphiphile ; bio-sourcé ; chimie 'click' ; polymères ; dérivés d'acide gras ; hémicelluloses ; hydrolyse ; thiol-ène ; xylanes

Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques



LCPO, UMR 5629
16 av. Pey Berland
F-33607 Pessac



Wood xylans value-creation: towards the synthesis of amphiphilic bio-based copolymers

Abstract

This thesis work aims to add value to xylans by designing new bio-based amphiphilic polymers.

Beechwood xylans were first fully characterized before their acidic hydrolysis. The hydrolysis conditions were optimized in order to obtain well-defined xylooligosaccharides, oligomeric chains of about six xylose units that have only one methylglucuronic acid unit positioned at the non-reductive chain end. Periodate oxidation of xylans was also studied in order to form new aldehyde groups within the xylan backbone in a controlled manner. The xylooligomers were then functionalized from their reductive end with an azide or an allyl group, providing the ability to couple these oligomers to fatty acid derivatives using 'click chemistry'.

The obtained amphiphilic oligomers were finally studied according to their surfactant and self-assembly properties. Their wetting properties were found to be very good, comparable to those found with Tween®80. Moreover, they self-assembled in both chloroform and water, where their structures were characterized *via* DLS and TEM. The resulting particles formed had a spherical micellar morphology, with a $d \leq 50$ nm. However, it was found that the particles had a tendency to form large aggregates, particularly in chloroform. The aggregates could be easily removed, either by filtration or by dilution of the sample, as the forces that govern the aggregation are low enough to allow dissociation with increasing solvent volume.

As previously mentioned, this thesis work led to the synthesis of bio-based amphiphilic oligomers starting from xylans, which are a potential byproduct in the paper/pulp industry. Thanks to their surfactant properties, numerous applications can be found for such a 'green' surfactant. Their biocompatibility added with their self-assembly nature in aqueous media makes them an attractive molecule for active substance delivery applications.

Keywords

amphiphilic ; bio-based ; 'click' chemistry ; polymers ; fatty acid derivatives ; hemicelluloses ; hydrolysis ; reductive amination ; thiol-ene ; xylans

Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques



LCPO, UMR 5629
16 av. Pey Berland
F-33607 Pessac



Table des matières

Liste des abréviations et acronymes.....	14
Introduction générale.....	17
Références.....	22
Etude bibliographique.....	23
Partie A. Des hémicelluloses du bois : les xylanes.....	25
I. Les hémicelluloses au sein de la paroi végétale.....	25
I.1. Structure de la paroi cellulaire.....	25
I.2. Composition de la paroi cellulaire.....	26
I.3. Interactions entre les xylanes et les autres constituants.....	31
II. Les xylanes du bois.....	32
II.1. Structures des xylanes.....	32
II.2. Biosynthèse des xylanes.....	33
II.3. Méthodes d'extraction des xylanes.....	36
II.4. Propriétés des xylanes.....	38
III. Valorisation industrielle des xylanes.....	39
III.1. Valorisation à l'état natif.....	39
III.2. Valorisation par 'bioraffinerie'	40
Partie B. Modification des xylanes : vers des matériaux fonctionnels.....	44
I. Hydrolyse acide partielle des xylanes	44
I.1. Hydrolyse acide.....	44
I.2. Effets des différents paramètres clés.....	45
II. Dérivatisations classiques.....	46
II.1. Estérification.....	47
II.2. Ethérification.....	49
II.3. Sulfatation.....	53

II.4.	Oxydation.....	54
III.	Autres modifications chimiques des xylanes.....	57
III.1.	Amination réductrice.....	57
III.2.	Copolymérisation 'grafting from'	59
III.3.	Copolymérisation 'grafting onto'	62
III.4.	Méthodes de réticulation.....	64
IV.	Valorisation industrielle des dérivés du xylane.....	64
IV.1.	Applications en papeterie.....	64
IV.2.	Applications biomédicales.....	65
IV.3.	Applications alimentaires.....	65
IV.4.	Applications comme hydrogel.....	67
IV.5.	Applications en tant que film.....	67
	Conclusion.....	69
	Références.....	70
	 Chapitre I. Caractérisation de xylanes de bois feuillus.....	 85
	Partie A. Caractérisation détaillée d'un des lots.....	87
I.	Composition en oses neutres des xylanes.....	87
I.1.	Analyse par HPLC.....	88
I.2.	Analyse par GC.....	89
II.	Analyse structurale.....	90
III.	Détermination de la masse molaire des xylanes.....	92
III.1.	Analyses par SEC.....	92
III.2.	Analyse MALDI-TOF.....	95
IV.	Comportement thermique.....	96
	 Partie B. Comparaison de 8 lots de xylanes.....	 98
I.	Les différents lots et les analyses effectuées	98
II.	Résultats.....	99
	Conclusion.....	101
	Références.....	102

Chapitre II. Synthèse et caractérisation d'oligomères de xylane bien définis.....105

Partie A. Optimisation de l'hydrolyse en milieu acide dilué.....107

- I. Plan d'expériences.....107
 - I.1. Mise en place du plan.....107
 - I.2. Résultats.....108
- II. Optimisation de la concentration en acide et du temps d'hydrolyse.....110

Partie B. Production des xylo-oligosaccharides.....113

- I. Répétabilité de l'hydrolyse en milieu acide dilué.....113
- II. Purification des XOS par précipitation sélective.....114
 - II.1. Effet du solvant.....114
 - II.2. Effet de la concentration en XOS.....116

Partie C. Caractérisation des xylo-oligosaccharides118

- I. Analyse MALDI-TOF.....118
- II. Analyse structurale.....119
 - II.1. Analyses RMN.....120
 - II.2. Détermination de la position de l'unité MeGlcA.....122
- III. Comportement thermique.....126

Conclusion.....128

Références.....129

Annexe du chapitre II.....132

Etude de la reproductibilité pour la production de XOS.....132

- I. Expériences et analyses réalisées.....132
- II. Résultats.....133

Chapitre III. Synthèse de dérivés fonctionnels du xylane.....135

Partie A. Oxydation au periodate de sodium.....137

I.	Etude préliminaire.....	137
I.1.	Méthodes de suivi de réaction.....	138
I.2.	Détermination du degré d'oxydation.....	139
II.	Etude de l'oxydation des xylanes filtrés.....	139
II.1.	Influence du taux de periodate.....	140
II.2.	Effet de la température.....	143
II.3.	Effet de la concentration en xylane.....	145
II.4.	Reproductibilité.....	147
III.	Etude de l'oxydation des xylo-oligosaccharides.....	148

Partie B. Amination réductrice.....151

I.	Amination réductrice des xylanes oxydés.....	151
II.	Amination des oligomères de xylanes.....	153
II.1.	Oligomères oxydés.....	153
II.2.	Fonctionnalisation par l'extrémité réductrice des oligomères non-oxydés.....	154

Conclusion.....159

Références.....160

Chapitre IV. Synthèse des oligomères amphiphiles.....163

Partie A. Synthèse des dérivés d'ester gras165

I.	Synthèse des dérivés d'ester gras porteurs de la fonction thiol.....	169
I.1.	Synthèse et caractérisation.....	169
I.2.	Comportement thermique.....	173
II.	Synthèse des dérivés d'ester gras porteurs de la fonction alcyne.....	174
II.1.	Synthèse et caractérisation.....	174
II.2.	Comportement thermique.....	178

Partie B. Les deux voies de couplage par 'chimie click'.....181

I.	Couplage thiol-ène.....	182
----	-------------------------	-----

II.	Couplage azoture-alcyne.....	184
II.1.	Synthèse et caractérisation.....	184
II.2.	Comportement thermique.....	188
	Conclusion.....	188
	Références.....	189

Chapitre V. Etude physico-chimique des oligomères amphiphiles.....193

Partie A. Auto-assemblage des oligomères amphiphiles en solution.....195

I.	Méthodologie mise en place.....	199
II.	Etude de l'auto-assemblage des oligomères amphiphiles en solution.....	200
II.1.	Etude dans le chloroforme.....	200
II.2.	Etude dans l'eau.....	206
II.3.	Discussion.....	211

Partie B. Propriétés tensioactives des oligomères amphiphiles.....213

I.	Détermination de la CMC.....	216
II.	Tension de surface air/liquide.....	219
III.	Mouillage.....	221
IV.	Pouvoir moussant.....	224
	Conclusion.....	227
	Références.....	228

Conclusion générale.....231

Partie Expérimentale.....237

Partie A. Matériels et Méthodes.....240

I.	Matériels.....	240
II.	Spectroscopies.....	241
II.1.	Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	241
II.1.1.	<i>Des xylanes et leurs dérivés.....</i>	<i>241</i>

II.1.2.	<i>Des dérivés d'acide gras</i>	242
II.2.	Spectrométrie d'absorption UV-Visible.....	243
II.3.	Spectrométrie Infra-Rouge.....	243
II.4.	Désorption-ionisation laser assistée par matrice à analyseur à temps de vol (MALDI-TOF)	243
II.5.	Ionisation par électronébulisation (ESI)	243
III.	Chromatographies.....	244
III.1.	En phase liquide à haute performance (HPLC)	244
III.2.	En phase liquide flash (FC)	244
III.3.	En phase gazeuse (GC)	244
III.3.1.	<i>GC-FID des xylanes</i>	244
III.3.2.	<i>GC-FID des dérivés d'acide gras</i>	245
III.4.	Par exclusion stérique (SEC)	245
III.4.1.	<i>SEC-RI des xylanes</i>	245
III.4.2.	<i>SEC-RI/MALLS des xylanes</i>	246
III.4.3.	<i>SEC-RI/UV des dérivés d'acide gras</i>	246
IV.	Analyses thermiques.....	246
IV.1.	Analyse thermogravimétrique (TGA)	246
IV.2.	Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)	247
V.	Diffusion dynamique de la lumière (DLS)	247
VI.	Microscopie électronique en transmission (TEM)	247
VII.	Fluorimètre.....	247
VIII.	Goniomètre.....	248
Partie B. Modes opératoires		249
I.	Chapitre I.....	249
I.1.	Ultrafiltration.....	249
I.2.	Hydrolyse totale.....	249
I.3.	Acétylation.....	250
II.	Chapitre II.....	250
II.1.	Synthèse des XOS.....	250

II.2.	Dosage du furfural.....	251
II.3.	Réaction de peeling.....	251
III.	Chapitre III.....	252
III.1.	Oxydation au periodate de sodium.....	252
III.2.	Suivi de la consommation de periodate.....	252
	<i>III.2.1. Titrage iodométrique.....</i>	252
	<i>III.2.2. Suivi par absorbance.....</i>	253
III.3.	Titrage des aldéhydes à l'hydroxylamine chlorhydrate.....	253
III.4.	Synthèse de l'azoture d'aminoéthyle.....	254
III.5.	Amination réductrice.....	254
IV.	Chapitre IV.....	254
IV.1.	Réaction de thiol-ène.....	254
IV.2.	Réaction de transestérification.....	255
IV.3.	Couplage thiol-ène.....	255
IV.4.	Couplage azoture-alcyne.....	255
V.	Chapitre V.....	256
V.1.	Détermination de la CMC par fluorimétrie.....	256
V.2.	Mesure des tensions de surface.....	256
V.3.	Mesure des angles de contact.....	257
V.4.	Test de Ross-Miles.....	257
	Références.....	258

Liste des abréviations et acronymes

Les hémicelluloses

Ara – arabinose

AX – arabinoxylane(s)

AGX – arabinoglucuronoxylane(s)

Csl – cellulose synthase-like

Fuc – fucose

Gal – galactose

GalA – acide galacturonique

GHs – glycosylhydrolases

Glu – glucose

GTs – glycosyltransférases

HX – homoxylane(s)

Man – mannose

MeGlcA – acide 4-*O*-méthyle- α -D-glucuronique

MGX – méthylglucuronoxylane(s)

PPS – poly(sulfate de pentosanes)(s)

Rha – rhamnose

XOS – xylo-oligosaccharide(s)

Xyl – xylose

Les réactifs

AM – anhydride maléique

BuOI – oléate de butyne

BuRic – ricinoléate de butyne

CDI – carbonyldiimidazole

chloro-HPTA – chlorure de 3-chloro-2-hydroxypropyltriméthylammonium

CL – caprolactone

DBTO – oxyde de dibutyltin(IV)

DHB – acide 2,5-dihydroxybenzoïque

DMPA – 2,2-diméthoxy-2-phénylacétophénone

EDTA – acide éthylènediamine tétraacétique

EPTA – 2,3-époxypropyltriméthyle ammonium

HEMA – hydroxyéthyle méthacrylate

HEMA-Im – HEMA-Imidazole

MeOI – oléate de méthyle

MeRic – ricinoléate de méthyle

PCL – polycaprolactone

PET – poly(téréphtalate d'éthylène)

PLA – poly(acide lactique)

PSS – poly(styrène sulfonate) de sodium

PTFE – polytétrafluoroéthylène

PVA – poly(alcool vinylique)

TBD – 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ène

TFA – acide trifluoroacétique

Les solvants

DCM – dichlorométhane

DMF – diméthyle formamide

DMSO – diméthyle sulfoxyde

EtOH – éthanol

MeOH – méthanol

iPrOH – isopropanol

THF – tétrahydrofurane

Les techniques d'analyses

DLS – diffusion dynamique de la lumière

DSC – calorimétrie différentielle à balayage

ELSD – détecteur de diffusion de lumière par évaporation

ESI – ionisation par électro-nébuliseur

FC – chromatographie en phase liquide flash

FID – détecteur à ionisation de flamme

GC – chromatographie en phase gazeuse

HPLC – chromatographie en phase liquide à haute performance

MALDI-TOF – ionisation laser assistée par matrice avec analyseur à temps de vol

MALLS – diffusion de la lumière laser aux multi-angles

MS – spectromètre de masse

RI – indice de réfraction (réfractomètre)

RMN – résonance magnétique nucléaire

SANS – diffusion des neutrons aux petits angles

SAXS – diffusion des rayons X aux petits angles

SEC – chromatographie par exclusion stérique

SLS – diffusion statique de la lumière

TEM – microscopie par transmission électronique

TGA – analyse thermogravimétrique

UV – ultra-violet (détecteur)

Les autres abréviations

AA – azoture-alcyne (couplage)

CGC – concentration de gelification critique

CMC – concentration micellaire critique

CMT – température micellaire critique

Đ – dispersité

DO – degré d'oxydation

\overline{DP}_n – degré de polymérisation moyen en nombre

DS – degré de substitution

\overline{M}_n – masse molaire moyenne en nombre

M_p – masse molaire au pic

\overline{M}_w – masse molaire moyenne en masse

Mt – millions de tonne

R_g – rayon de giration

R_h – rayon hydrodynamique

TE – thiol-ène (couplage)

Tg – température de transition vitreuse

Introduction générale



Le XX^e siècle a été le siècle dit 'du tout fossile', durant lequel le développement industriel a beaucoup puisé dans les ressources fossiles non renouvelables. Le pétrole représente aujourd'hui la première source d'énergie consommée dans le monde. Outre l'énergie, les ressources fossiles sont aussi utilisées pour produire les 'matières plastiques' dont la production représente environ 7% de la consommation mondiale de pétrole et de gaz [1]. En 2012, la production de polymères était de 265 millions de tonnes [2] et chaque année, cette production croît d'environ 4% en volume ! Face à l'épuisement inéluctable des ressources pétrolières et l'augmentation croissante du taux de CO₂ dans l'atmosphère, notre société doit nécessairement passer de l'ère du jetable à l'ère du recyclable et du renouvelable.

L'orientation de l'industrie vers des matières premières renouvelables constitue un enjeu majeur pour lequel la biomasse offre des perspectives prometteuses. Le simple constat de différence du temps de régénération de la source de carbone est sans appel. Il est de 1 à 50 ans pour la biomasse contre quelques millions d'années pour les ressources fossiles. Le secteur de la chimie amorce aujourd'hui une mutation de la pétrochimie (pétro-raffinerie) vers l'agrochimie (bio-raffinerie). À la condition qu'elle ne concurrence pas la chaîne alimentaire, l'agrochimie offre des solutions originales aux risques économiques et écologiques, notamment en diminuant l'empreinte carbone ainsi que les émissions de gaz à effet de serre des produits finis. Ainsi, l'alternative de la biomasse s'intègre peu à peu à l'industrie chimique et notamment dans le secteur des carburants. Le défi à venir est donc colossal; il vise d'une part, à produire par bio-raffinerie tous les intermédiaires réactionnels et produits chimiques connus de la pétrochimie (mimétisme) et, d'autre part, à concevoir de nouvelles molécules et matériaux bio-sourcés. La déconstruction partielle et la modification directe de la biomasse lignocellulosique est également une voie importante à considérer.

Les bioplastiques¹ s'installent progressivement dans le paysage économique des polymères avec une production globale en 2012 d'environ 1,4 millions de tonnes soit moins de 1% de la production totale des 'plastiques' (Figure 1). Les estimations pour 2017 prévoient une production d'environ 6,2 millions de tonnes [3]. La production de bioplastiques utiliserait alors 1,2 millions d'hectares de terres agricoles soit environ 0,02% des 5 milliards d'hectares

¹ Par 'bioplastiques' sont considérés les matériaux plastiques qui sont soit bio-sourcés, soit biodégradables soit les deux.

actuellement cultivés dans le monde. L'agrochimie est donc loin d'entrer en compétition avec les cultures pour l'alimentation humaine et animale.

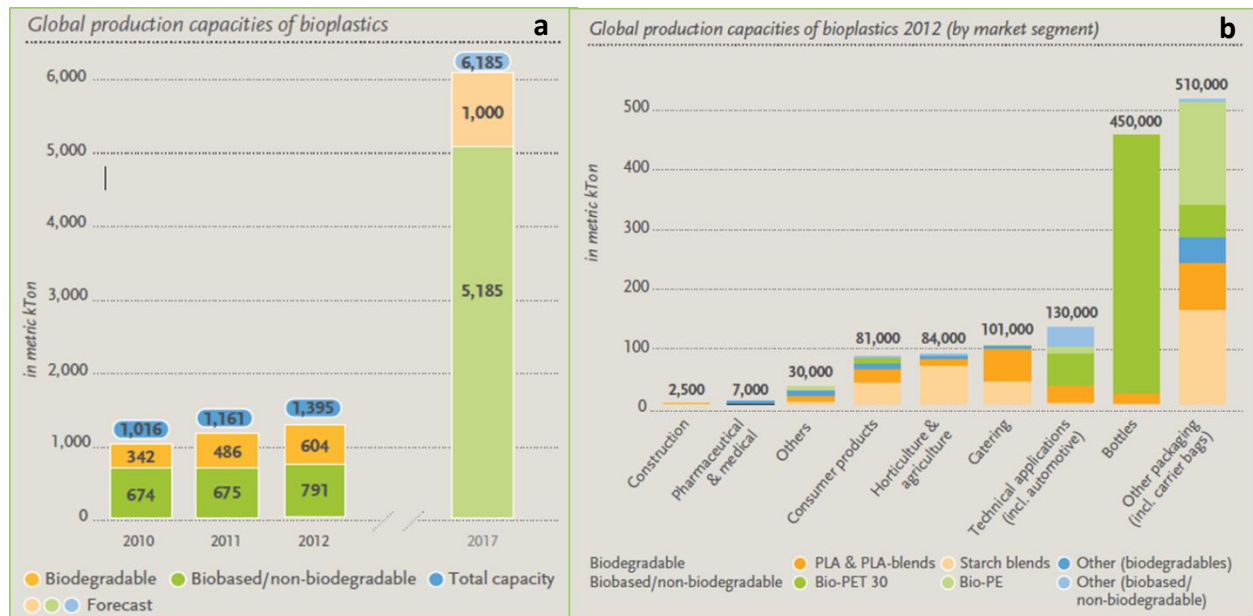


Figure 1. Production globale de bioplastiques (a) et production 2012 par secteur industriel (b) [3]

Il existe trois voies principales pour la production de plastiques bio-sourcés, énoncées dans l'ordre croissant d'importance [4]:

- les polymères d'origine bactérienne : les bactéries se servent des sucres pour produire des polyesters par fermentation. C'est le cas des poly(hydroxyalcanoate)s élaborés par fermentation bactérienne des sucres du maïs, par exemple ;
- les polymères bio-sourcés issus de la polymérisation de monomères bio-sourcés tel le poly(acide lactique) ;
- les biopolymères végétaux, directement extraits de la plante. Les plus utilisés actuellement sont la cellulose et l'amidon.

Ces polymères bio-sourcés possèdent, en général, des propriétés mécanique et thermique limitées. Pour pallier cela, ces derniers peuvent être associés à d'autres polymères d'origine végétale ou à des polymères d'origine fossile et intègrent avec succès certains marchés tels que l'emballage, la restauration (films alimentaires, couverts et assiettes jetables, etc.) ou l'agri- et l'horticulture (films de paillage agricole).

Il existe deux grandes classes de ressources renouvelables, plutôt abondantes et ‘bon marché’, les huiles végétales et la biomasse lignocellulosique. Les huiles végétales ont d’ores et déjà été établies comme ressources renouvelables pour les polymères bio-sourcés avec la synthèse de polyesters, polyamides, polyanhydrides, analogues des polyoléfines, polyuréthanes et résines époxy [5,6]. Concernant la biomasse lignocellulosique, la cellulose est déjà utilisée depuis des siècles pour les textiles et la papeterie par exemple. La modification chimique de la cellulose a permis au fil des siècles de modifier ses propriétés et d’élargir son champ d’application (additifs alimentaires, vernis, panneaux isolants, etc.). Les hémicelluloses, quant à elles, sont peu exploitées et ce, malgré leur diversité structurale, leur abondance et leur faible coût de récupération. Dans le procédé Kraft², une partie des hémicelluloses se retrouvent dans la liqueur noire qui est brûlée pour, entre autres, générer de l’énergie. Or, le pouvoir calorifique des hémicelluloses est faible par rapport à celui de la lignine (17,5 contre 26,6 MJ/kg), leur combustion n’est donc pas un bon moyen de valorisation de ces polysaccharides [7,8]. Il serait intéressant de les valoriser autrement en les extrayant du bois avant la cuisson. La conception de nouveaux matériaux polymères issus d’hémicelluloses présenterait un fort intérêt en raison du caractère biocompatible et biodégradable de ce polysaccharide.

À cela, s’ajoutent les concepts de ‘chimie verte’ qu’il faut prendre en compte. En effet, il ne s’agit pas seulement d’utiliser des ressources renouvelables mais aussi de les exploiter dans des conditions des plus respectueuses de l’Homme et l’Environnement. Ceci implique, entre autres, l’application des ‘12 principes de la chimie verte’ qui ont été introduits en 1998 par Anastas et Warner ; lesquels peuvent être regroupés en quatre catégories principales [9] :

- L’utilisation de matières premières renouvelables
- L’utilisation de produits chimiques et de solvants moins toxiques
- La limitation de la pollution et des déchets
- L’optimisation des procédés en termes de rendements et d’économie d’atomes.

² Le procédé Kraft représente environ 90% de la production de pâte à papier. La cuisson du bois est réalisée en solution basique en présence de sulfure de sodium dans un réacteur entre 150 et 170°C pendant 2 à 5 heures. À la fin de la cuisson, la liqueur extraite contenant la lignine et une partie des hémicelluloses, dite liqueur noire, est concentrée puis brûlée afin de fournir de l’énergie au procédé mais surtout pour récupérer le sulfure de sodium et la soude.

Dans ce contexte, l'objectif de mon travail de thèse est de proposer une nouvelle voie de valorisation des xylanes de bois feuillus par la synthèse de nouveaux copolymères amphiphiles et bio-sourcés. La première partie de ce manuscrit est donc consacrée à une étude bibliographique sur les xylanes de bois feuillus, de leur origine à leur valorisation industrielle.

Dans la seconde partie de ce manuscrit, seront présentés les résultats expérimentaux divisés en cinq chapitres. Le premier chapitre traitera de la caractérisation complète de xylanes de deux différentes sources de bois feuillus, le hêtre et le bouleau. Le deuxième chapitre sera consacré à l'optimisation des conditions d'hydrolyse pour la synthèse et la production d'oligomères de xylanes de masse molaire contrôlée, ainsi qu'à la caractérisation complète des oligomères obtenus. Toujours concernant les xylanes, le troisième chapitre traitera de leurs modifications chimiques, oxydation au periodate et amination réductrice, afin de les rendre fonctionnels pour des réactions de couplage.

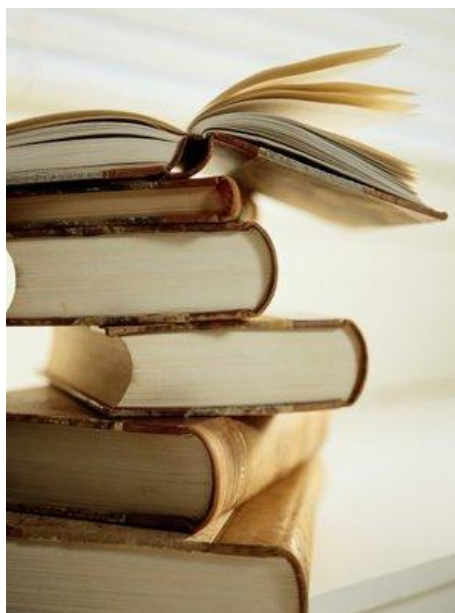
Le quatrième chapitre sera consacré à la synthèse de deux blocs hydrophobes dérivés de corps gras et à leurs couplages aux oligomères de xylanes fonctionnalisés. Le cinquième et dernier chapitre traitera de l'étude physico-chimique des oligomères amphiphiles ainsi synthétisés.

Ce travail s'inscrit dans un partenariat entre le Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques (**LCPO**) et deux centres techniques représentant deux filières majeures de la biomasse, l'Institut des Corps Gras (**ITERG**) et l'Institut Technologique Forêt Cellulose Bois-construction Ameublement (**FCBA**).

Références

- [1] Mülhaupt R. Green Polymer Chemistry and Bio-based Plastics: Dreams and Reality. *Macromol Chem Phys* 2013;214:159–74.
- [2] European Bioplastics. Green chemistry and bioplastics. Berlin: 2012.
- [3] European Bioplastics. Bioplastics, facts and figures. Berlin: 2013.
- [4] Shen L, Haufe J, Patel MK. Product overview and market projection of emerging bio-based plastics. Utrecht: 2009.
- [5] Lligadas G, Ronda JC, Galià M, Cádiz V. Monomers and polymers from plant oils via click chemistry reactions. *J Polym Sci Part A Polym Chem* 2013;51:2111–24.
- [6] More AS, Maisonneuve L, Lebarbé T, Gadenne B, Alfos C, Cramail H. Vegetable-based building-blocks for the synthesis of thermoplastic renewable polyurethanes and polyesters. *Eur J Lipid Sci Technol* 2013;115:61–75.
- [7] Peng F, Peng P, Xu F, Sun R-CC. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. *Biotechnol Adv* 2012;30:879–903.
- [8] Sarlos G, Haldi P-A, Verstraete P. Systèmes énergétiques. *Trait Génie Civ* 2003;21.
- [9] Anastas PT, Warner JC. Green Chemistry: Theory and Practice. Oxford Uni. New York: 1998.

Etude bibliographique



Ce travail de thèse propose d'explorer une voie de valorisation des xylanes du bois par la conception de nouveaux copolymères amphiphiles bio-sourcés. Ainsi, cette étude bibliographique discutera dans une première partie des généralités concernant les xylanes ainsi que de leur valorisation à l'état natif ou par dépolymérisation totale. Une seconde partie développera le potentiel des xylanes comme polymères naturels pour la préparation de nouveaux biomatériaux par *post-modifications* chimiques.

Sommaire

Partie A.	25
Des hémicelluloses du bois : les xylanes	25
I. Les hémicelluloses au sein de la paroi végétale	25
I.1. Structure de la paroi cellulaire	25
I.2. Composition de la paroi cellulaire	26
I.3. Interactions entre les xylanes et les autres constituants	31
II. Les xylanes du bois	32
II.1. Structures des xylanes	32
II.2. Biosynthèse des xylanes	33
II.3. Méthodes d'extraction des xylanes	36
II.4. Propriétés des xylanes	38
III. Valorisation industrielle des xylanes	39
III.1. Valorisation à l'état natif	39
III.2. Valorisation par 'bioraffinerie'	40
Partie B.	44
Modification des xylanes : vers des matériaux fonctionnels	44
I. Hydrolyse acide partielle des xylanes	44
I.1. Hydrolyse acide	44
I.2. Effets des différents paramètres clés	45
II. Dérivatisations classiques	46
II.1. Estérification	47
II.2. Ethérification	49
II.3. Sulfatation	53
II.4. Oxydation	54
III. Autres modifications chimiques des xylanes	57
III.1. Amination réductrice	57
III.2. Copolymérisation 'grafting from'	59
III.3. Copolymérisation 'grafting onto'	62
III.4. Méthodes de réticulation	64
IV. Valorisation industrielle des dérivés du xylane	64
IV.1. Applications en papeterie	64
IV.2. Applications biomédicales	65
IV.3. Applications alimentaires	65
IV.4. Applications comme hydrogel	67
IV.5. Applications en tant que film	67
Conclusion	69
Références	70

Partie A.

Des hémicelluloses du bois : les xylanes

La première crise pétrolière de 1973 amorça un changement de perception de l'énergie fossile, et la prise de conscience de la finité des ressources fossiles. En effet, que ce soit le pétrole, le charbon ou le gaz naturel, ils se régénèrent très lentement par rapport à leur vitesse de consommation [1]. De ce fait, il existe un intérêt grandissant pour les ressources renouvelables, que ce soit pour un aspect énergétique ou matériaux. En science des matériaux, de nombreuses ressources naturelles présentent un fort potentiel pour le remplacement des ressources fossiles, dont la biomasse lignocellulosique, composée principalement de polysaccharides. Le plus abondant de ces polysaccharides et le plus valorisé actuellement est la cellulose. Néanmoins, les hémicelluloses présentent un fort potentiel au regard de leur abondance et de leur diversité structurale. Dans ce travail de thèse, les xylanes, qui sont les hémicelluloses les plus abondantes dans les bois feuillus, seront étudiés. Actuellement, l'industrie est capable de les extraire mais le coût du procédé, lié aux valorisations actuellement faibles des hémicelluloses, n'est pas économiquement viable. Les xylanes du bois sont donc des coproduits potentiels de l'industrie papetière qui, en raison de leurs structures et propriétés, sont de bons candidats à l'élaboration de biomatériaux fonctionnels.

I. Les hémicelluloses au sein de la paroi végétale

I.1. Structure de la paroi cellulaire

Les tissus du bois sont constitués de cellules dont les membranes sont liées entre elles par la paroi cellulaire. Cette paroi possède une structure rigide microfibrillaire qui est enrobée d'une matrice hydrosoluble et gélifiante. Différents niveaux d'organisation lui confèrent à la fois élasticité et rigidité : la paroi est souple et extensible pour permettre la croissance cellulaire mais aussi 'ferme' pour permettre la cohésion des cellules, le maintien de l'organisme, et assurer son rôle de barrière protectrice [2]. Le constituant principal de la paroi cellulaire du bois est la cellulose (40-50%). L'assemblage de fibres de cellulose constituant la paroi cellulaire est renforcé par la lignine (15-35%) qui agit ici tel un ciment organique. Les hémicelluloses (15-

35%), polymères hétérogènes ramifiés, sont souvent considérées comme agents compatibilisants de la cellulose et de la lignine. Les parois des cellules végétales possèdent donc une structure complexe, qui varie en fonction des espèces et de l'âge de l'organisme. Cette dernière est définie selon un modèle à trois zones [2] (Figure 1) :

- Lamelle moyenne : riche en lignine et en pectines, et contenant peu de cellulose, elle sert à la cohésion intercellulaire
- Paroi primaire : composée de microfibrilles de cellulose dispersées sans orientation préférentielle dans une matrice amorphe (lignine, pectines, hémicelluloses et protéines), elle est assez souple pour permettre la croissance cellulaire
- Paroi secondaire : c'est un réseau fibrillaire de cellulose cristalline en forte proportion, comportant aussi la majorité des hémicelluloses. Il existe trois régions distinctes - S1, S2 et S3 - suivant l'orientation des fibrilles. La lignine vient imprégner l'ensemble de la paroi en fin de croissance cellulaire, assurant le port du végétal.

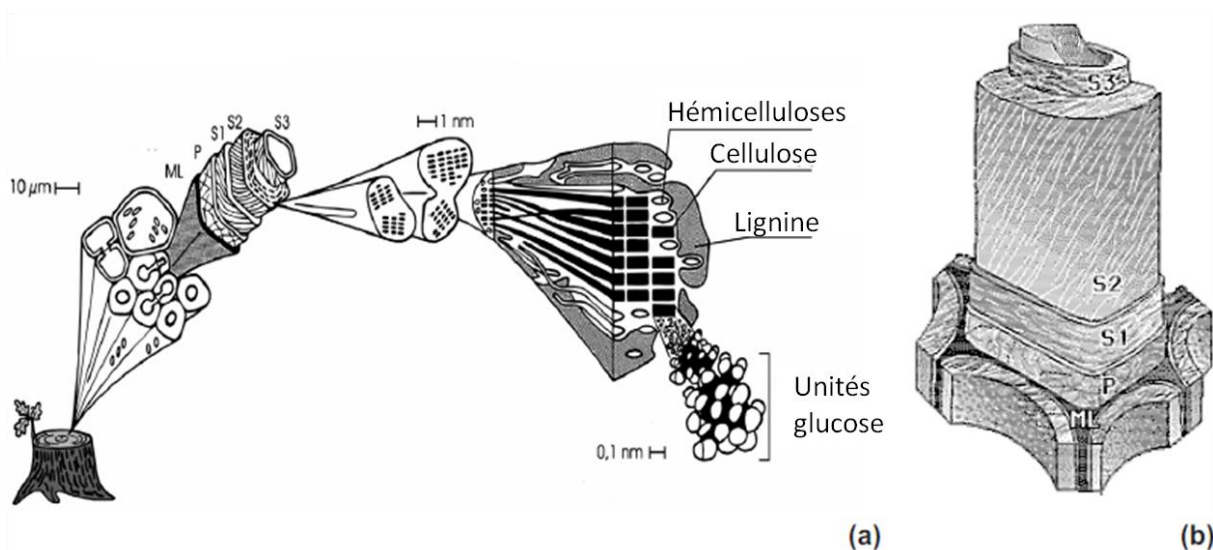


Figure 1. Les différentes couches de la paroi cellulaire ainsi que leur composition (a), et la paroi cellulaire avec ses différentes zones (b, avec ML pour lamelle moyenne, P pour paroi primaire et S pour paroi secondaire)

I.2. Composition de la paroi cellulaire

Les parois primaires de différents végétaux présentent une grande similitude dans leur composition polysaccharidique, alors que la composition de leurs parois secondaires peut considérablement varier : de 40 à 80% de cellulose, de 10 à 40% d'hémicelluloses et de 5 à 25% de lignine [3].

Cellulose

La cellulose est la ressource polymère renouvelable la plus abondante sur Terre. C'est un homopolymère linéaire avec comme motif de répétition le cellobiose c'est-à-dire deux unités D-anhydroglucopyranose liées en β -1,4 [4] (Figure 2). Son degré de polymérisation moyen (\overline{DP}_n) peut varier de quelques centaines à quelques milliers selon sa provenance.

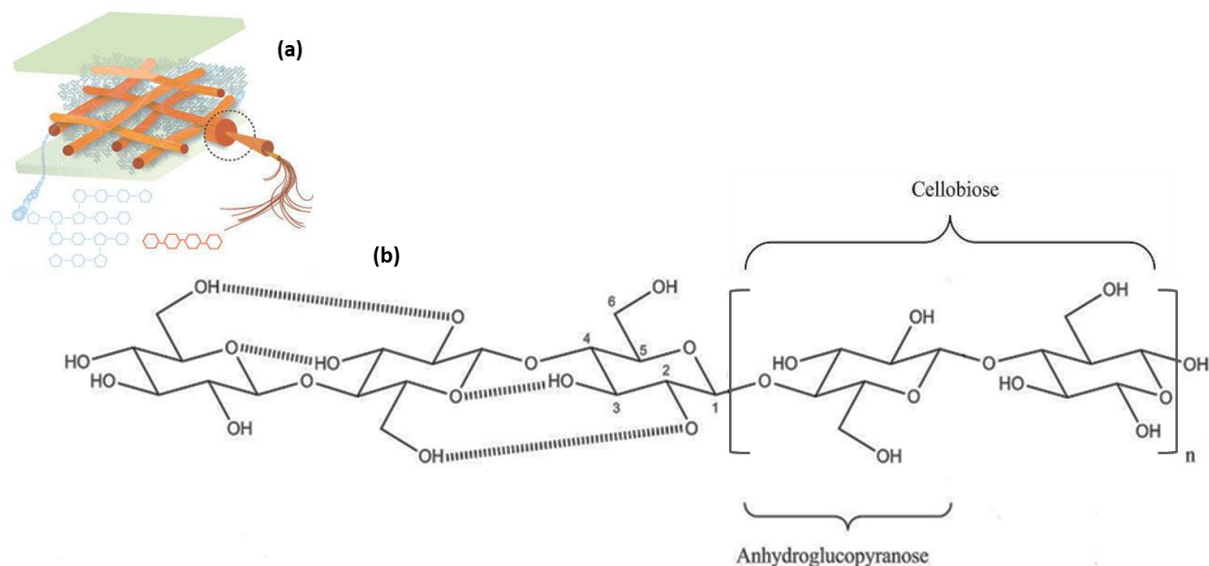


Figure 2. La cellulose au sein de la paroi végétale (a) et sa structure (b)

Sur son squelette, deux unités successives sont décalées d'un angle de 180° l'une par rapport à l'autre, la molécule forme une hélice à deux unités par tour, stabilisée par des liaisons hydrogène entre deux motifs successifs comme illustré Figure 2-b. De plus, l'absence de substituant permet à la cellulose de s'organiser en structure microcristalline stabilisée par des liaisons hydrogène intra- et intermoléculaires. Il existe alors des zones ordonnées lorsque le nombre des liaisons hydrogène est élevé, et des zones amorphes lorsque le nombre de ces liaisons est plus faible [4]. La cellulose est donc dans un état solide semi-cristallin avec un caractère fibrillaire. De plus, cette cristallinité confère à la cellulose une bonne résistance chimique, enzymatique et mécanique. Insoluble dans l'eau et dans les solvants organiques classiques, la cellulose est néanmoins soluble dans des systèmes complexes métallique/amine comme par exemple le chlorure de lithium/N,N-diméthylacétamide [5], ou dans les liquides ioniques [6,7].

Lignine

La lignine est un polyphénol tridimensionnel de masse molaire élevée et donc difficilement soluble. Elle possède une importante variabilité de sa structure en fonction de son origine mais aussi de son environnement climatique. Elle confère rigidité aux parois cellulaires et ses propriétés, antioxydante et hydrophobe, permettent de protéger les plantes de leur environnement. La lignine est formée aléatoirement par couplage oxydant de trois unités phénoliques dérivées de l'alcool cinnamique (Figure 3-b). Ces monomères constitutifs sont assemblés par différentes liaisons, éther ou carbone-carbone, illustrées en Figure 3-c. Ce réseau, difficilement dégradé et résistant aux agents chimiques et biochimiques, est réactif par ses groupements phénol et hydroxyle.

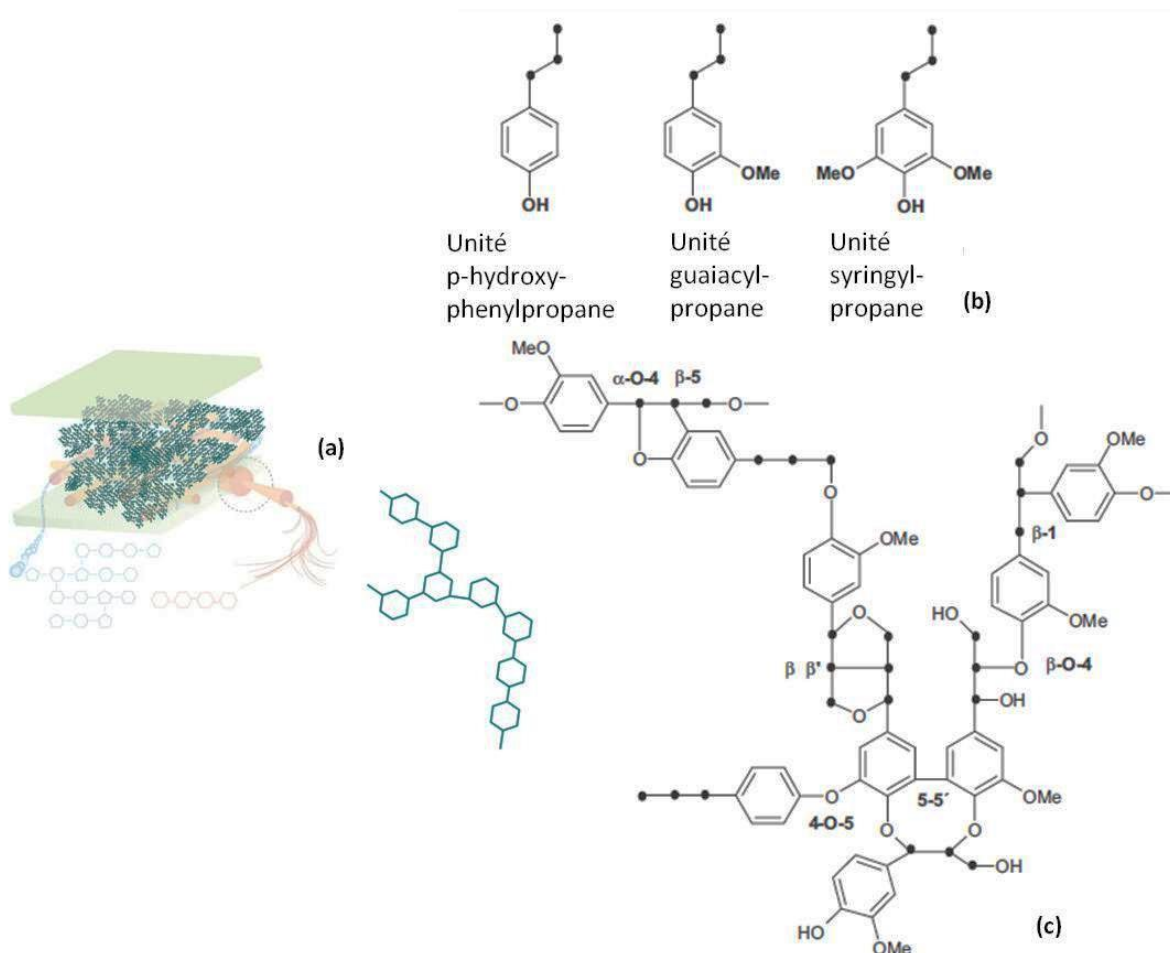


Figure 3. La lignine au sein de la paroi végétale (a), la structure moléculaire des trois motifs constitutifs de la lignine (b) et le modèle de lignine représentant les principales liaisons entre motifs (c).

Adapté de Sixta et al., 2008 [8]

Hémicelluloses

Les hémicelluloses sont les polysaccharides du bois les plus abondants après la cellulose. Elles ont été définies dès 1891 par Schulze comme étant ‘les polysaccharides extractibles à partir de plantes supérieures par des solutions aqueuses alcalines’. C’est-à-dire qu’elles regroupent tous les polysaccharides de la paroi, hors cellulose et pectines. En effet, les pectines sont extractibles à l’eau chaude avec des solutions acide ou chélatante [9].

Les hémicelluloses possèdent une grande diversité structurale, fonction de leur origine, du tissu cellulaire mais aussi du stade de maturité des tissus. De façon générale, ce sont des polymères ramifiés donc amorphes et de plus faibles masses molaires que la cellulose avec des \overline{DP}_n souvent inférieurs à 200. Ce sont des polysaccharides constitués de différents sucres, les pentoses (xylose (**Xyl**), arabinose (**Ara**)), les hexoses (galactose (**Gal**), glucose (**Glu**), mannose (**Man**)), les désoxyhexoses (rhamnose (**Rha**), fucose (**Fuc**)) ainsi que les acides uroniques (acide glucuronique et méthylglucuronique) liés entre eux par liaisons glycosidiques [10] (Figure 4). De manière générale, les hémicelluloses formées d’hexoses se trouvent dans les résineux, le blé et l’orge alors que celles constituées de pentoses dans les feuillus, l’avoine et le seigle [11].

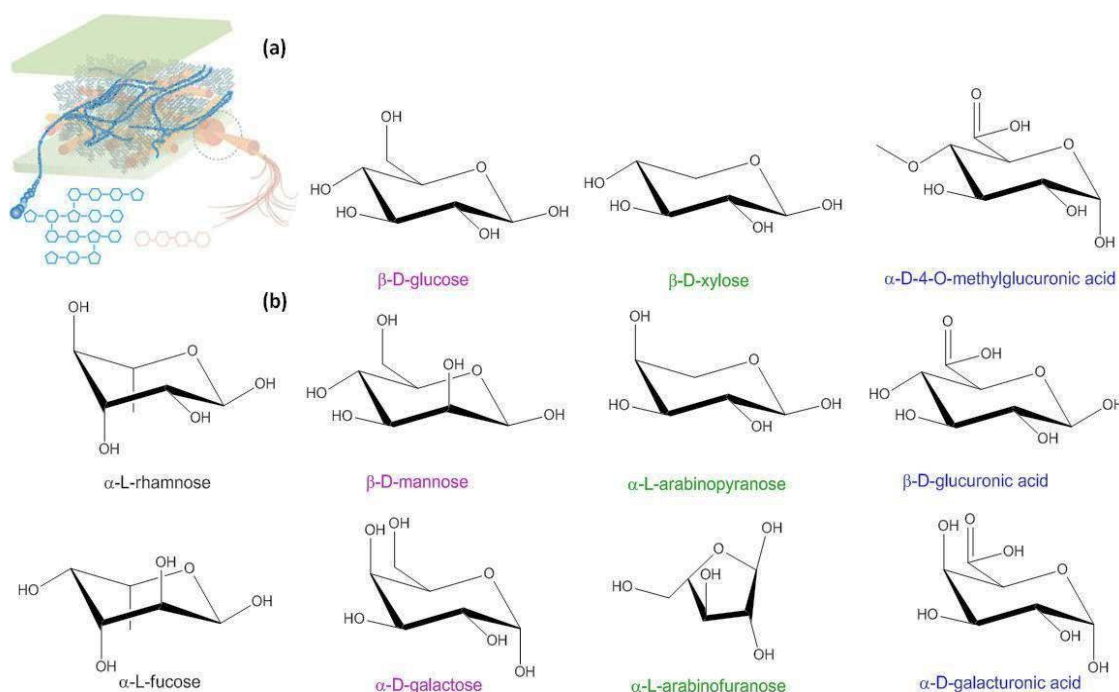


Figure 4. Les hémicelluloses au sein de la paroi végétale (a) et les différentes unités les plus représentées dans les hémicelluloses (b). Adapté de Fengel et Wegener, 1989 [10]

La chaîne principale d'une hémicellulose peut être constituée d'un seul type d'unités, les homopolymères comme les xylanes, ou de plusieurs unités de natures différentes, les hétéropolymères comme les glucomannanes ou encore les galactoglucomannanes. La capacité d'absorption de grandes quantités d'eau des hémicelluloses serait à l'origine de l'élasticité des parois cellulaires, et du caractère flexible des plantes. Les hémicelluloses participent au maintien des tissus végétaux.

Xylanes

Les xylanes sont les polysaccharides pariétaux non-cellulosiques les plus abondants dans la nature pouvant représenter jusqu'à un tiers de la paroi cellulaire des bois, voire la moitié pour les plantes annuelles. Il s'agit d'un polymère linéaire, un squelette d'unités D-xylopyranose liées en β -1,4, avec des ramifications irrégulières. Le squelette décrit une hélice gauche en ruban à 3 unités xylose par tour avec deux unités successives décalées d'un angle de 120° [12,13]. La conformation en hélice du xylane est plus flexible que celle de la cellulose car elle est stabilisée par une seule liaison hydrogène intramoléculaire (H-3 avec O-5 du cycle suivant, Figure 5) contre deux dans le cas de la cellulose [14].

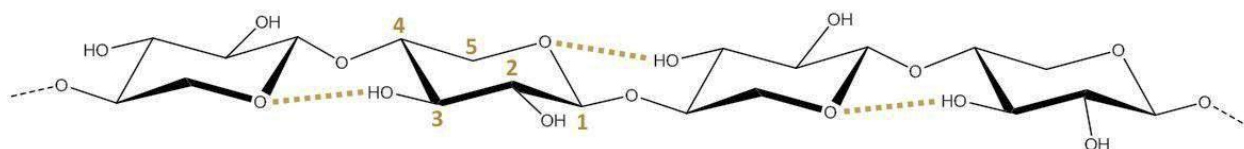


Figure 5. Structure d'un homoxylane et représentation des liaisons hydrogène intramoléculaires

Les unités latérales sont le plus généralement de l'arabinose ou de l'acide 4-O-méthyl- α -D-glucuronique (**MeGlcA**). Les xylanes sont, soit uniquement composés d'oses neutres (homoxylanes (**HX**) et arabinoxylanes (**AX**)), soit partiellement ramifiés par des MeGlcA (méthylglucuronoxylanes (**MGX**) et arabinoglucuronoxylanes (**AGX**)) [15]. Les AX et AGX se trouvent dans les parois des herbacés alors que les MGX sont les constituants principaux de la paroi secondaire des bois feuillus et de certaines céréales. Toutes les familles de xylanes peuvent être partiellement acétylées (de 3 à 13%) en O-2 et/ou O-3 [9].

I.3. Interactions entre les xylanes et les autres constituants

Le rôle complexe de la paroi cellulaire nécessite de 'bonnes' interactions entre les différents constituants. La cellulose et la lignine n'interagissent pas entre elles : ce sont les hémicelluloses qui servent de liens. Liées de façon covalente à la lignine, elles interagissent avec la cellulose par liaisons hydrogène et interactions Van des Waals. Les xylanes sont liés à la lignine par liaison éther avec le xylose et par liaison ester avec le MeGlcA [16,17].

Les xylanes revêtent les microfibrilles de cellulose, permettant de former un réseau entre les microfibrilles et les autres polysaccharides de la paroi cellulaire par des interactions fortes de type liaisons hydrogène et interactions Van der Waals [18]. La distribution des substituants des xylanes influence ces interactions et ce sont les régions les moins substituées qui participent le plus à ces liaisons [19,20]. De plus, grâce à la distribution des MeGlcA, il est possible que la conformation en hélice gauche du xylane puisse se changer en hélice en ruban à 2 résidus xylose par tour. Ainsi, le xylane adopte la même conformation que la cellulose, favorisant les interactions [13,21,22]. Dans le modèle proposé par Bromley *et al.*, les MeGlcA sont tous positionnés à l'extérieur de l'hélice, créant une surface d'interaction chargée qui favorise les interactions avec la lignine. Cette surface chargée pourrait aussi aider à l'assemblage et à la consolidation de la paroi cellulaire.

Il existe donc une relation directe entre la conformation des polysaccharides et leur fonction à l'intérieur de la paroi [23]. Notons que la nature, la stabilité et l'intensité des interactions entre les xylanes et les autres constituants de la paroi conditionneront le rendement et la qualité de l'extraction des xylanes [10].

II. Les xylanes du bois

II.1. Structures des xylanes

Dans le bois, les taux d'hémicelluloses sont environ les mêmes entre feuillus et résineux (25-35%) mais leur nature est différente. Dans le cas des résineux, les mannanes sont majoritaires à hauteur de 18%, viennent ensuite les xylanes de type AGX (Figure 6-b) à 10%. Les feuillus contiennent en grande majorité des xylanes partiellement acétylés (25-35%) de type MGX (Figure 6-a), avec seulement peu de motifs mannane.

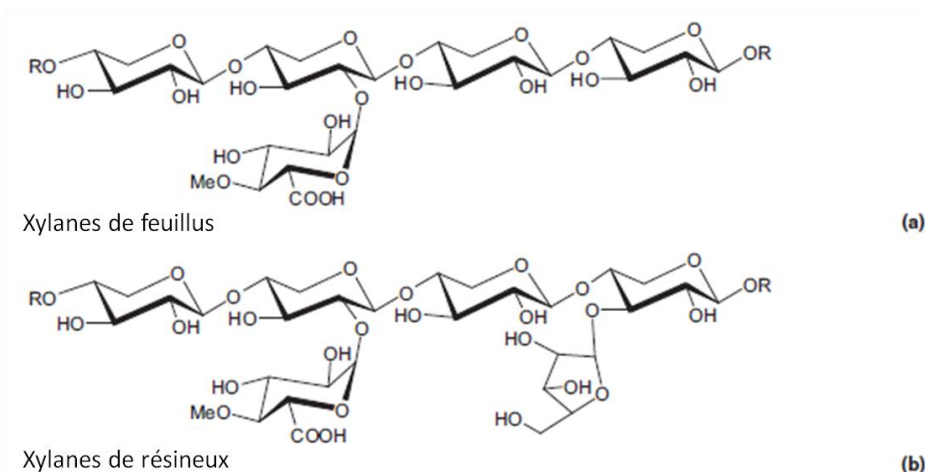


Figure 6. Structures des xylanes de feuillus (a) et de résineux (b) avec $R = H$ ou acétyle.
Adapté de Sixta et al., 2008 [8]

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la valorisation des xylanes du bois comme coproduits potentiels de l'industrie papetière. Nous nous sommes donc concentrés sur les bois feuillus qui contiennent le plus de MGX. Leur structure et leur \overline{DP}_n , généralement compris entre 100 et 200 [24], peuvent varier en fonction de l'espèce mais aussi du mode d'extraction utilisé [25].

Les résidus MeGlcA sont liés en position O-2 aux unités xylose par liaison α -1,2 à raison d'environ 10 unités xylose par MeGlcA (Figure 6-a). La distribution des MeGlcA des MGX peut être estimée, soit par l'étude structurale des oligomères produits par hydrolyse acide ou enzymatique, soit par la mesure du coefficient d'activité du contre ion calcium dans une solution de polysaccharide à substituants carbonyle [9]. Toutes les études ne s'accordent pas sur la distribution des MeGlcA : ils pourraient soit être distribués de manière irrégulière et

aléatoire [26–28] soit être en moyenne distribués toutes les 8 à 10 unités xylose [9,10,13,29,30]. Ce point précis sera discutée au regard de la biosynthèse des xylanes des Arabidopsis dans le paragraphe suivant.

Rhamnose et acide galacturonique (**GaIA**) sont aussi en général observés en faible quantité ($\leq 2\%$) dans les MGX de bois feuillus. Plus précisément, une séquence tétrasaccharidique (β -1,4-Xyl- α -1,3-Rha- α -1,2-GaIA- β -1,4-Xyl) est observée à l'extrémité réductrice des xylanes d'un certain nombre d'espèces dont le bouleau [31,32].

II.2. Biosynthèse des xylanes

La synthèse des xylanes a commencé à être étudiée dans les années 1960 par Bailey et Hassid mais de nombreux aspects restent toujours méconnus [33]. Comme pour les autres hémicelluloses, la biosynthèse du squelette des xylanes pourrait impliquer des enzymes de la famille 'cellulose synthase-like' (**Csl**) mais ceci n'a pas été prouvé [34]. D'autre part, de nombreuses glycosyltransférases (**GTs**) de différentes familles pourraient être impliquées dans la synthèse du squelette des xylanes, *i.e.* GTs IRX9 et 14 de la famille 43 et IRX10 de la famille 47 [18]. Ces GTs encoderaient les xylosyltransférases nécessaires à la synthèse du xylane puisque l'abondance et le \overline{DP}_n des xylanes en dépendent [31].

D'autres GTs, *i.e.* IRX7 (aussi appelé FRA8) de la famille 47 ainsi que IRX8 (aussi appelé GAUT12) et PARVUS (aussi appelé GATL1) de la famille 8, seraient impliquées dans la biosynthèse du tétrasaccharide de l'extrémité réductrice (Figure 7). La fonction du tétrasaccharide dans la biosynthèse du xylane semble primordiale. *A priori*, ce tétrasaccharide sert de 'cran d'arrêt' à l'élongation du squelette après qu'un certain \overline{DP}_n soit atteint [18,35]. En effet, des xylanes mutants ne disposant pas des gènes nécessaires à la synthèse du tétrasaccharide, possèdent des \overline{DP}_n d'une grande hétérogénéité. Contrairement à la cellulose qui est synthétisée au niveau de la membrane plasmique à la surface de la cellule, les xylanes sont synthétisés dans l'appareil de Golgi puis transportés dans la paroi cellulaire. La biosynthèse des xylanes nécessite donc la coordination des enzymes citées précédemment ainsi que d'enzymes responsables du transport des substrats dans l'appareil de Golgi. Il semblerait qu'il existe un complexe de différentes

protéines permettant la biosynthèse des xylanes. Par exemple IRX9, IRX14 ainsi qu'une ou plusieurs Csl pourraient se combiner en un complexe capable de catalyser l'élongation du squelette des xylanes de l'extrémité non-réductrice vers l'extrémité réductrice terminée par le tétrasaccharide [35].

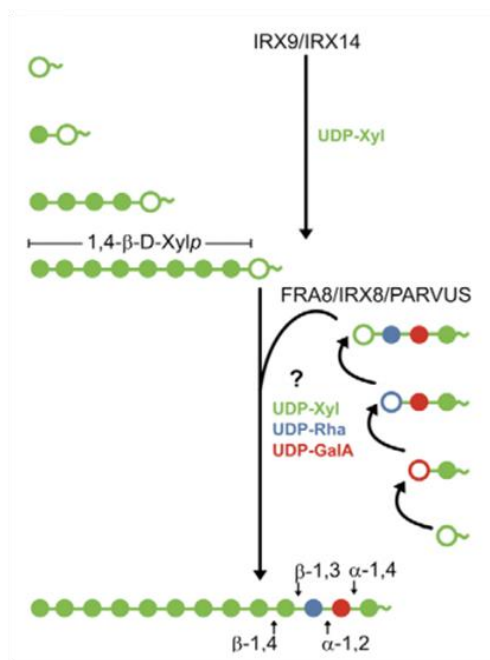


Figure 7. Illustration schématique de la biosynthèse du squelette des xylanes (York et O'Neill, 2008 [35])

La biosynthèse du squelette des xylanes recèle encore bien des mystères. Elle est néanmoins bien distincte de celle des substituants qui est mieux connue [36]. Les glucuronosyltransférases (gènes GUX1 et 2) pour les acides glucuroniques, les méthyltransférases (gène GXMT) pour le méthyle des MeGlcA et les acétyltransférases (gène TBL29) pour les groupements acétyle (Figure 8) sont à l'origine de la substitution des xylanes [31].

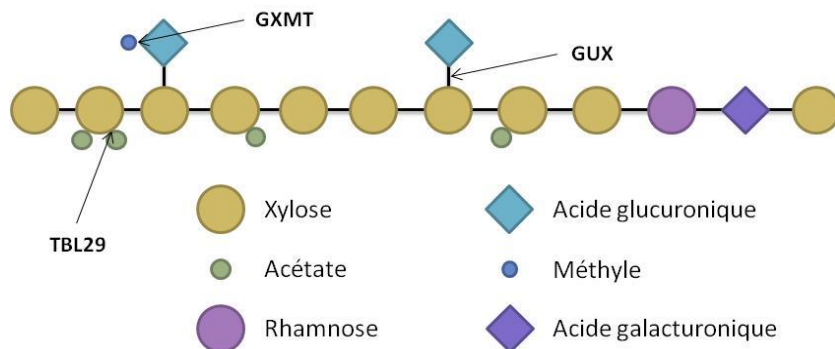


Figure 8. Représentation schématique des MGX avec les gènes connus comme intervenant dans la biosynthèse des substituants de ces derniers

Bromley *et al.* ont mis en évidence que les gènes GUX1 et GUX2 conduisent à des schémas de distribution des MeGlcA différents. GUX1, responsable de la synthèse de la grande majorité des substituants, conduit à une distribution uniforme des MeGlcA avec un espacement¹ généralement de 8-10 unités xylose mais pouvant aller jusqu'à 26 unités. Les espacements sont alors majoritairement et étrangement pairs. Quant à GUX2, responsable de la synthèse d'une minorité des substituants, il conduit à des espacements de 5-7 unités xylose qui sont indifféremment pairs ou impairs [13,36].

Pour chaque gène, le nombre moyen d'unités xylose par MeGlcA a été mesuré. Il est de $9,7 \pm 0,5$ pour GUX1 et de $15,8 \pm 1,4$ pour GUX2. Les xylanes synthétisés par GUX1 et GUX2 sont donc complètement différents (Figure 9). Avec GUX1, l'espacement moyen entre deux unités xylose correspond au nombre moyen d'unités xylose par MeGlcA, les xylanes sont donc homogènes avec un espacement de 8-10 unités. A l'inverse, avec GUX2 le nombre moyen d'unités xylose par MeGlcA est bien supérieur à l'espacement moyen entre deux unités xylose, ce qui signifie qu'un domaine du xylane doit être substitué environ toutes les 5-7 unités mais que d'autres domaines sont totalement dépourvus de MeGlcA [13].

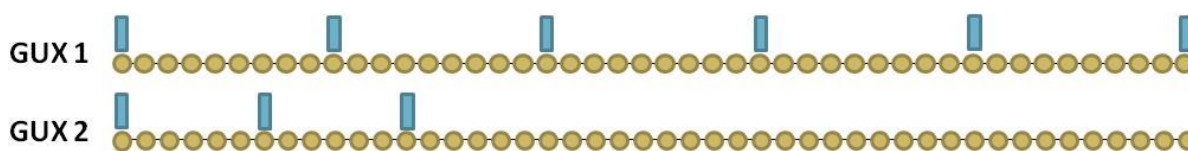


Figure 9. Représentation schématique des deux types de xylanes qui seraient synthétisés si GUX1 ou GUX2 s'exprimait indépendamment

Ces deux gènes à actions différentes conduisent à la synthèse de xylanes de structures variées puisqu'une même chaîne de xylane peut à la fois être encodée par GUX1 et GUX2 [13]. Il est donc vraisemblable que les MeGlcA des xylanes ne soient pas distribués de manière aléatoire mais par blocs. Suivant les gènes exprimés, il est possible de trouver, sur une même chaîne, des domaines ramifiés toutes les 8 ou 10 unités xylose (GUX1), des domaines ramifiés environ toutes les 5 unités xylose (GUX2) ou des domaines non ramifiés (GUX2). Rappelons tout de même que GUX1 est le gène encodant la plus grande majorité des substituants.

¹ 'espacement' signifie ici le nombre d'unités xyloses comprises entre deux ramifications MeGlcA

Finalement, il a aussi été montré que des glycosylhydrolases (**GHs**) sont impliquées dans la formation des xylanes de dicotylédones : xylanase et xylosidase ont été montrées comme participant au remodelage des xylanes après leur synthèse [18,37,38]. Néanmoins, leur mode d'action ainsi que le but du remodelage restent mal connus.

II.3. Méthodes d'extraction des xylanes

Dans l'industrie papetière, durant la fabrication de la pâte à papier par procédé Kraft, une grande partie des hémicelluloses sont dégradées, concentrées puis brûlées. L'extraction en amont, réalisée directement sur les copeaux de bois, permettrait de les extraire avant qu'elles ne soient dissoutes dans la liqueur de cuisson [19,25,39]. De nombreuses méthodes d'extraction ont été mises au point pour isoler les xylanes. Parmi elles, l'extraction alcaline, avec ou sans co-solvant. Selon la nature du végétal, l'extraction peut être réalisée avec ou sans délignification préalable comme pour les parois primaires qui contiennent peu de lignine [40]. La délignification peut avoir lieu avant l'extraction en milieu aqueux souvent par NaClO_2 ou 'one pot' par extraction en milieu alcalin en présence de peroxydes (H_2O_2) permettant d'obtenir des hémicelluloses relativement pures (3 à 5% de lignine résiduelle) et surtout de s'affranchir de l'étape coûteuse de délignification utilisant NaClO_2 .

L'extraction des xylanes est limitée par les interactions présentes entre eux et les autres constituants du bois (voir section I.3.). En effet, il est impossible d'extraire les xylanes sans rompre les liaisons xylane/lignine, ce qui peut impliquer des conditions d'extraction relativement fortes. Le choix des conditions d'extraction va influencer le rendement mais aussi la sélectivité et l'éventuelle dégradation des xylanes. Lors d'une extraction en milieu alcalin, il peut y avoir modification (désacétylation) voire dégradation (élimination des ramifications acides et/ou dépolymérisation par réaction de peeling) du polymère [41]. La première réaction qui a généralement lieu est la saponification des groupements ester d'acétyle conduisant donc à l'élimination de la grande majorité des groupements acétyle. Stoklosa et Hodge ont étudié l'impact de la concentration en soude (0-75 g/L) sur l'extraction des hémicelluloses du bouleau à 85°C pendant 1h [19]. Le rendement de l'extraction passe d'environ 5% pour une concentration de 15 g/L à 14% pour 50 g/L. L'augmentation de la concentration en soude,

favorise donc l'extraction des xylanes mais il reste à savoir si les xylanes ainsi extraits n'ont pas été dégradés. Augmenter la concentration en soude jusqu'à 75 g/L ne dépolymérise pas les xylanes, au contraire, il semblerait qu'augmenter le pH de l'extraction permet l'obtention de xylanes de plus fortes masses molaires [19].

Notons que dans ce travail, les xylanes utilisés ont été extraits en milieu alcalin et seront donc a priori désacétylés.

Pour adoucir les conditions d'extraction sans diminuer le rendement, il est possible de réaliser une étape préliminaire de purification des parois cellulaires. Un prétraitement d'explosion à la vapeur peut par exemple être réalisé en amont [42,43]. Il est également possible d'éliminer les substances lipidiques et phénoliques qui incrustent les polysaccharides, généralement par des extractions successives à différents solvants, polaires (éthanol) et apolaires (toluène, benzène, acétone).

Pour limiter la désacétylation en milieu basique, l'extraction peut aussi se faire en solvant organique, généralement les alcools (méthanol et éthanol), le diméthylsulfoxyde (**DMSO**), ou les mélanges eau/solvant organique. L'extraction au DMSO donne néanmoins de faibles rendements, généralement inférieurs à 50% [44]. Sans compter, que les grands volumes de solvant nécessaire, le prix du DMSO ainsi que la difficulté à le récupérer vont limiter son utilisation.

Pour augmenter les rendements, l'extraction peut être combinée à des traitements mécaniques et/ou thermiques pour rendre les hémicelluloses plus accessibles. L'application d'ultrasons ou de micro-ondes pendant l'extraction alcaline est très efficace sur les rendements sans affecter les structures des macromolécules [9,41,45]. Néanmoins, la puissance des ultrasons ou micro-ondes ne doit pas être trop élevée au risque d'altérer voire de dépolymériser les xylanes. En milieu alcalin, l'utilisation d'un 'réacteur extrudeur' permet une extraction en continue et une réduction des quantités de solvant utilisées [46–49].

Quelle que soit la technique d'extraction utilisée, un mélange de polysaccharides est obtenu qui doit ensuite être purifié pour obtenir des fractions homogènes. La purification la plus utilisée est la précipitation sélective de différentes fractions d'hémicelluloses par ajout de solvants organiques miscibles à l'eau, l'éthanol est le solvant le plus utilisé [19,41]. Une graduation de la quantité de co-solvant utilisé va permettre de fractionner et donc de purifier les xylanes extraits. Il est par exemple possible d'isoler les xylanes de plus fortes masses molaires et les moins ramifiés à faible pourcentage d'éthanol alors qu'à fort pourcentage en éthanol, les xylanes de faibles masses molaires et les plus ramifiés seront isolés [50]. Sur le même principe, il est possible d'isoler différentes fractions d'hémicelluloses par ajout de sels $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ en différentes quantités [51–53]. Il est aussi possible d'isoler les polysaccharides ramifiés des non ramifiés par précipitation à l'iode. Dans une solution aqueuse de polysaccharides contenant du chlorure de calcium, il est possible de faire précipiter les polymères non ramifiés par ajout d'iodure de potassium [54]. Les polymères ramifiés restent en solution. Cette technique a fonctionné sur la séparation de différents xylanes de peuplier et de caragancier en solution dans le chlorure de potassium [55,56]. Enfin il est possible de purifier les xylanes par filtration (micro, nano, ultra), par osmose inverse, par chromatographie d'exclusion stérique, chromatographie par échange d'ions ou encore par combinaison de différentes méthodes déjà citées.

II.4. Propriétés des xylanes

Propriétés en solution aqueuse

Les xylanes ont tendance à s'organiser pour aligner les chaînes et conduisent ainsi à une structure partiellement cristalline stabilisée par liaisons hydrogène intra- et intermoléculaires [57]. Néanmoins, la présence de substituants limite ce phénomène. Plus les xylanes sont substitués, plus ils sont solubles dans l'eau. Un xylane très peu ou non substitué sera alors quasi insoluble dans l'eau. Pour rompre ses liaisons hydrogène, il est nécessaire d'utiliser des solvants protiques et complexants, connus pour la solubilisation de la cellulose, tels que le cuoxam $([\text{Cu}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_4](\text{OH})_2)$ et le cadoxen $([\text{Cd}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)_3](\text{OH})_2)$, avec en plus des traitements physiques (ultrasons et chauffage). La présence potentielle de lignine résiduelle après extraction est aussi responsable de l'agrégation des xylanes dans l'eau [9].

Propriétés rhéologiques

De façon générale, les hémicelluloses dont les xylanes, ont des propriétés d'épaississant, d'émulsifiant, de gélifiant, d'absorbant ou encore d'adhésif. En solution aqueuse, les hémicelluloses sont rhéofluidifiantes et viscoélastiques [58].

Des MGX de hêtre ont montré des comportements de fluidification avec cisaillement et de thixotropie à des concentrations supérieures à 5 w/v% [9,59]. Ce comportement est influencé par l'acidité du milieu selon la forme du groupement carbonyle des MeGlcA. Le pKa de MeGlcA est de l'ordre de 3,0-3,3 [60,61].

Propriétés interfaciales

Les polysaccharides ne sont pas considérés comme des agents de surface, néanmoins les MGX de hêtre ainsi que des AX ont montré une activité de surface [9]. Ils sont capables de diminuer la tension de surface de l'eau qui passe de 72,0 à 46,0 mN/m à une concentration micellaire critique comprise entre 0,03 et 0,60 w/v%. La plupart des xylanes stabilisent des émulsions huile dans eau avec une activité comparable à celle du Tween 20. Les auteurs justifient ces propriétés par la présence de protéine ou de lignine résiduelle qui aide à cet effet stabilisant.

III. Valorisation industrielle des xylanes

III.1. Valorisation à l'état natif

A l'heure actuelle, la majorité des hémicelluloses extraites lors de cuissons papetières sont brûlés pour libérer de l'énergie mais une partie des xylanes peut aussi être utilisée comme liants et adhésifs ou encore comme agents de rétention pour les fibres. L'addition d'hémicelluloses dans la pâte à papier améliore la rétention des charges qui modifient les propriétés optiques du papier.

Les AX natifs possèdent aussi des propriétés nutritionnelles d'intérêt pour les secteurs alimentaire et pharmaceutique. Les xylanes n'étant pas dégradés par les enzymes digestives humaines, ils sont utilisés comme fibres alimentaires et permettent ainsi d'aider au transit intestinal. En outre, leur consommation diminuerait de manière significative le taux de cholestérol dans le sang et les réponses au glucose et à l'insuline après les repas [59,62]. Grâce à

leurs propriétés physico-chimiques, les xylanes se dissolvent ou se dispersent dans l'eau pour former des solutions ou suspensions visqueuses. Ils modifient alors la texture du milieu auquel ils sont ajoutés et sont utilisés dans les secteurs agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique, comme épaississants, émulsifiants ou encore comme agents gélifiants. Les AX auraient, par exemple, de l'avenir dans la fabrication du pain [52,59]. En effet, en plus de leurs qualités nutritionnelles, ils seraient responsables des propriétés mécaniques de la pâte ainsi que de la texture.

Concernant les MGX, ceux extraits de hêtres japonais ont montré des propriétés inhibitrices du taux de croissance de tumeurs, probablement en raison de la stimulation indirecte de la défense immunologique non spécifique du patient [63,64].

Les xylanes, sont donc valorisables à l'état natif mais ce n'est pas leur principale voie de valorisation. Leur hydrolyse en sucres et en molécules plateforme pour l'industrie chimique offre des voies de valorisation plus attrayantes.

III.2. Valorisation par 'bioraffinerie'

L'une des approches pour rendre économiquement viable l'utilisation des xylanes est de les dépolymériser en sucres pour ensuite les convertir en produits chimiques ou en carburant. Il s'agit d'une approche type 'bioraffinerie' [65,66]. Il existe différentes méthodes pour dépolymériser les xylanes.

La première méthode qui a été employée pour dépolymériser les xylanes est l'hydrolyse acide. Il s'agit d'utiliser des acides forts tels que l'acide sulfurique, nitrique ou chlorhydrique ou encore l'acide trifluoroacétique (**TFA**) à des concentrations adaptées à l'obtention de xylose ou de dérivés du xylose [67]. En plus de la concentration en acide, la température et le temps d'hydrolyse sont des paramètres clefs pour contrôler les produits obtenus. Les hydrolyses acide ont l'avantage d'être simples à mettre en œuvre et relativement peu chères. Par contre, elles ont l'inconvénient d'être peu voire non sélectives et de potentiellement dégrader les xylanes en acides organiques ou dérivés furaniques qui sont des inhibiteurs de la fermentation des sucres.

L'autohydrolyse est une méthode d'hydrolyse douce qui suit le même mécanisme que l'hydrolyse acide. Comme son nom l'indique, l'hydrolyse est auto-catalysée par la molécule elle-même, c'est-à-dire par les acides uroniques et par les groupements acétyle des xylanes. Cette technique, propre aux hémicelluloses, est respectueuse de l'environnement puisqu'aucun réactif n'est ajouté. Cette réaction peut être modulée par la température et le temps d'hydrolyse mais son contrôle est plus délicat que pour l'hydrolyse acide [68].

Comme alternative à l'hydrolyse acide, l'hydrolyse enzymatique a l'avantage d'être une méthode respectueuse de l'environnement, douce, sélective et formant peu de sous-produits [41]. Une catégorie d'enzymes va sélectivement hydrolyser un seul type de liaisons osidiques, par exemple les liaisons β sans dégrader les liaisons α , et inversement pour une autre catégorie d'enzymes. Pour arriver à une dépolymérisation complète des hémicelluloses, il est donc nécessaire d'utiliser un cocktail d'enzymes de différentes catégories, ce sont les hémicellulases [69]. Pour les xylanes, les endo-1,4- β -xylanases hydrolysent aléatoirement les liaisons internes β -1,4 entre deux unités xylose, libérant ainsi un mélange d'oligomères. Les β -xylosidases, quant à elles, libèrent des xyloses en éliminant, une par une, les unités de l'extrémité non-réductrice. Ce sont les hémicellulases les plus utilisées grâce à leurs applications dans l'industrie papetière [70]. Afin de pouvoir éliminer les unités MeGlcA liées en α -1,2 le long du squelette, il est nécessaire de faire intervenir, en sus des xylanases et xylosidases, des α -D-glucuronidases. Les enzymes étant sensibles à leur environnement, la maîtrise des paramètres réactionnels est souvent critique. De trop fortes températures ou des pH extrêmes peuvent dénaturer les enzymes et ainsi les rendre inefficaces. Pour les xylanases, par exemple, le pH doit se situer entre 4 et 9 et les températures doivent être comprises entre 40 et 80°C pour une efficacité enzymatique optimale [71].

Ces différentes techniques peuvent conduire - selon les conditions utilisées - à l'obtention des sucres élémentaires, majoritairement du xylose. Le xylose a par exemple été utilisé dans une crème anti-âge mise sur le marché par L'Oréal sous le nom de Proxylane®. Cette crème contient du Proxylane® associé à de l'acide hyaluronique. Le produit commercialisé sous le nom de Derma Genèse aide à préserver la jeunesse de la peau et à lutter contre le vieillissement cutané

en stimulant la synthèse de glycoaminoglycane ainsi qu'en favorisant leur fixation sur les cellules dermiques.

Le xylose peut être valorisé en tant que tel mais peut aussi subir différentes fermentations, déshydratations ou hydrogénations pour obtenir toute une gamme de produits dont certains présentent une forte valeur ajoutée [23] (Figure 10). Parmi eux, l'éthanol, le xylitol et le furfural sont à fort intérêt industriel :

- L'éthanol produit à partir des déchets des industries agricoles et forestières (cellulose et/ou hémicelluloses) est du bioéthanol de seconde génération. Les sucres issus de ces polysaccharides du bois sont alors fermentés par des micro-organismes [72]. Des micro-organismes génétiquement modifiés sont aussi à l'étude pour permettre l'hydrolyse et la fermentation en une seule étape et ainsi diminuer les coûts de production [73].
- Le xylitol est obtenu par hydrogénation du xylose (réduction de la fonction aldéhyde en fonction alcool) [74]. Le xylitol (E967) est un édulcorant alimentaire d'intérêt puisque que son pouvoir sucrant est similaire à celui du saccharose mais son apport calorique est inférieur avec 2,4 kcal/g contre 4,0 kcal/g pour le saccharose. De plus, le xylitol a un effet rafraîchissant et possède un caractère inhibiteur vis-à-vis de la formation des caries, ce qui en fait un candidat parfait comme additif sucrant dans les chewing-gums et autres friandises. Il est aussi utilisé dans les dentifrices [75].
- Le furfural est obtenu par déshydratation du xylose. Il est à la base de nombreux dérivés d'intérêt. La réduction du furfural conduit, par exemple, à l'alcool furfurylique qui est largement exploité pour l'obtention de résines furaniques, très résistantes à haute température et aux agents chimiques. Le furfural permet aussi l'accès à de nombreux monomères : vinyliques, acryliques, méthacryliques ou époxydes alors polymérisables [76].

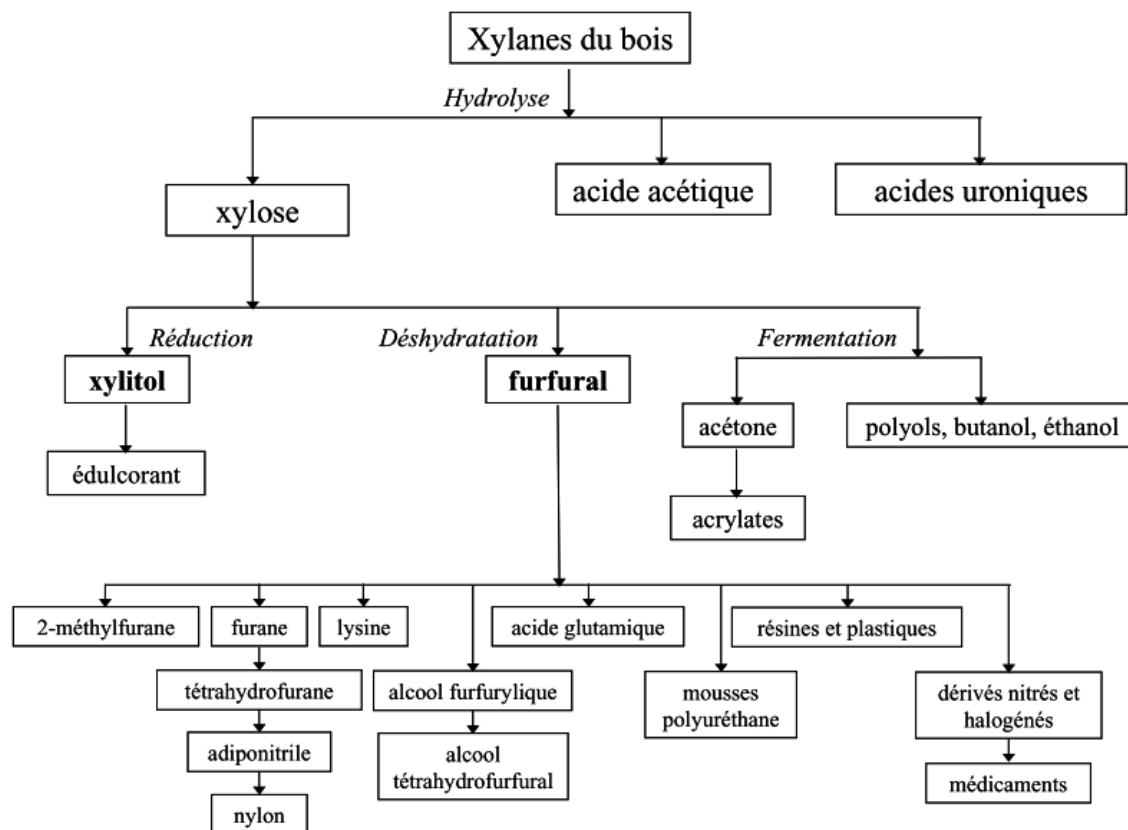


Figure 10. Schématisation des différentes molécules obtenues et leurs applications par hydrolyse des xylanes. Moine, 2005, adapté de Popa, 1996 [23,77]

Malgré ces différentes voies de valorisation, l'extraction des xylanes ne bénéficie pas encore d'une véritable viabilité économique : les coûts liés à l'extraction et à la purification de différents constituants du bois, dont les xylanes, sont encore trop importants. Des modifications chimiques des xylanes pourraient leur apporter de nouvelles propriétés et ainsi les conduire à devenir des produits à haute valeur ajoutée et rendre leurs extraction et purification économiquement viables.

Partie B.

Modification des xylanes : vers des matériaux fonctionnels

I. Hydrolyse acide partielle des xylanes

L'hydrolyse acide permet de valoriser les xylanes par obtention de xylose mais d'oligomères. Il y a plusieurs raisons à l'intérêt que représente la synthèse de xylooligosaccharides (**XOS**). Plusieurs revues récentes traitent d'ailleurs du sujet [74,78–82]. Premièrement, les XOS sont reconnus pour avoir des propriétés nutritionnelles modifiant le goût et ayant des bienfaits sur la santé (voir IV.3). De plus, les XOS à structure définie sont des substrats d'importance pour servir de modèles à la compréhension et à l'optimisation des procédés d'hydrolyse. Enfin, l'utilisation de XOS dans la synthèse de copolymères est un enjeu actuel ayant pour but la synthèse de polymères bioactifs et biocompatibles, sans oublier le caractère biodégradable de ces XOS. L'intérêt est donc d'obtenir, par hydrolyse acide, des oligomères de xylane qui seraient plus purs et mieux définis que les xylanes d'origine permettant de leur apporter une plus forte valeur ajoutée.

I.1. Hydrolyse acide

Le mécanisme d'hydrolyse des liaisons osidiques est représenté Figure 11 [83]. La première étape est la protonation du pont oxo, générant un ion oxonium. Cet ion permet la coupure hydrolytique et l'addition d'eau va ensuite régénérer l'extrémité réductrice. La rupture hydrolytique a lieu aléatoirement le long du squelette xylose, néanmoins, la liaison glycosidique à l'extrémité non-réductrice du xylane s'hydrolyse 1,8 fois plus rapidement qu'une liaison interne [84]. Inversement, la liaison osidique en α entre une unité xylose et une unité MeGlcA est particulièrement stable à l'hydrolyse [85]. Cette résistance conduit, après hydrolyse, à l'obtention d'un mélange contenant, entre autres, des acides aldobiuroniques, dimères constitués d'une unité xylose liée à un MeGlcA [86]. Au début de la réaction, la formation de XOS est importante, surtout lors de l'hydrolyse en milieu acide dilué. Leur dépolymérisation en monomères sera ensuite affectée par la quantité d'acide [86,87].

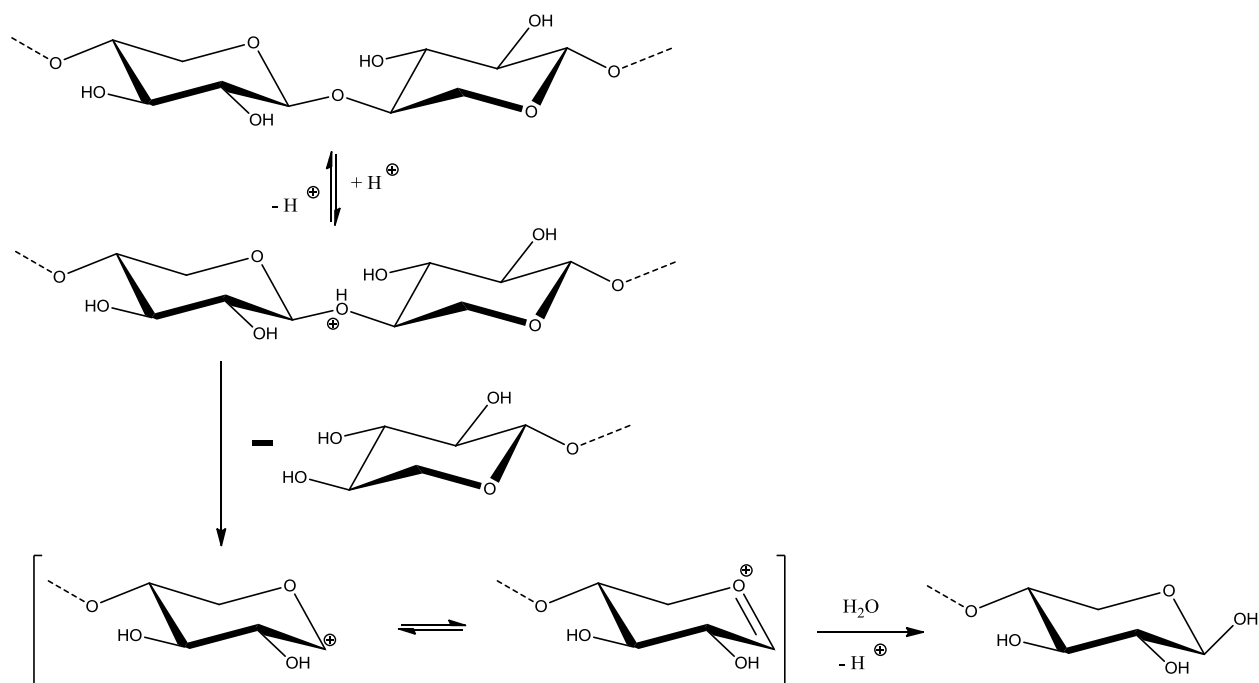


Figure 11. Mécanisme de l'hydrolyse acide. Adapté de Lai, 2001 [83]

I.2. Effets des différents paramètres clés

Différents paramètres sont importants à optimiser pour contrôler le rendement de production des XOS mais aussi leur taille : la température et le temps de réaction, la nature et la concentration de l'acide utilisé et la concentration en xylanes. Un grand nombre d'études portent sur l'optimisation des conditions d'hydrolyse pour une dépolymérisation totale [88–93], celles concernant l'obtention de XOS sont plus rares [94–96]. Notons aussi, qu'il est difficile de comparer les études entre elles et d'en tirer des conclusions puisque l'optimisation des conditions d'hydrolyse porte sur certains paramètres qui sont liés entre eux.

La température est un paramètre à contrôler des plus cruciaux lors de l'hydrolyse en milieu acide dilué. En effet, il va affecter la cinétique mais aussi la sélectivité de l'hydrolyse [82]. De nombreux types d'acides, organiques ou non, ont été testés pour l'hydrolyse des xylanes. Parmi eux, l'acide sulfurique a principalement été utilisé, mais aussi le TFA [87] ou oxalique [97]. Les acides inorganiques sont bon marché mais les acides organiques ont l'avantage d'être doux et donc plus propices à une hydrolyse contrôlée. Il est d'ailleurs possible d'hydrolyser sélectivement les unités arabinose d'un arabinoxylane en utilisant l'acide oxalique [97].

Les acides inorganiques ont souvent l'inconvénient de laisser des sels après neutralisation. Le TFA, quant à lui, est aisément éliminé grâce à sa faible température d'ébullition (72,4 °C). Pour s'affranchir de l'étape de neutralisation, il est aussi envisageable d'utiliser une catalyse acide hétérogène, ce qui n'a pas été étudié sur les xylanes. Néanmoins, de l'inuline a été hydrolysé en fructose à 95% en utilisant de la zéolite à 100°C pendant 2h [98].

Concernant la concentration en acide, la cinétique de réaction augmente avec la concentration en acide [82]. Néanmoins, dans un souci de contrôle de l'hydrolyse, les fortes concentrations en acide sont à éviter. De plus, la distribution des \overline{DP}_n des XOS après hydrolyse acide dépend de la concentration en acide [95]. De faibles concentrations permettent d'atteindre des XOS de plus haut \overline{DP}_n .

Akpinar *et al.* (2009) ont étudié la synthèse de XOS par hydrolyse acide modérée [96]: leur meilleur rendement de 13% (\overline{DP}_n compris entre 2 et 6 majoritairement) a été obtenu par une hydrolyse de xylanes à 2% dans 0,25 M d'acide sulfurique pendant 30 min. Il a été observé qu'après 60 min de réaction, la quasi-totalité des xylanes été dépolymérisés jusqu'au monomère.

II. Dérivatisations classiques

Comme d'autres polysaccharides, les xylanes possèdent de nombreux groupements hydroxyle fonctionnalisables par divers réactifs (Figure 12). Les xylanes sont composés de pentoses et possèdent donc 2 groupements hydroxyle par unité glycosidique. L'efficacité de ce type de réaction est déterminée par la mesure du degré de substitution (**DS**) qui correspond au nombre moyen de motifs greffés par unité glycosidique. Le DS maximal théorique est donc égal à 2 pour le xylane [99].

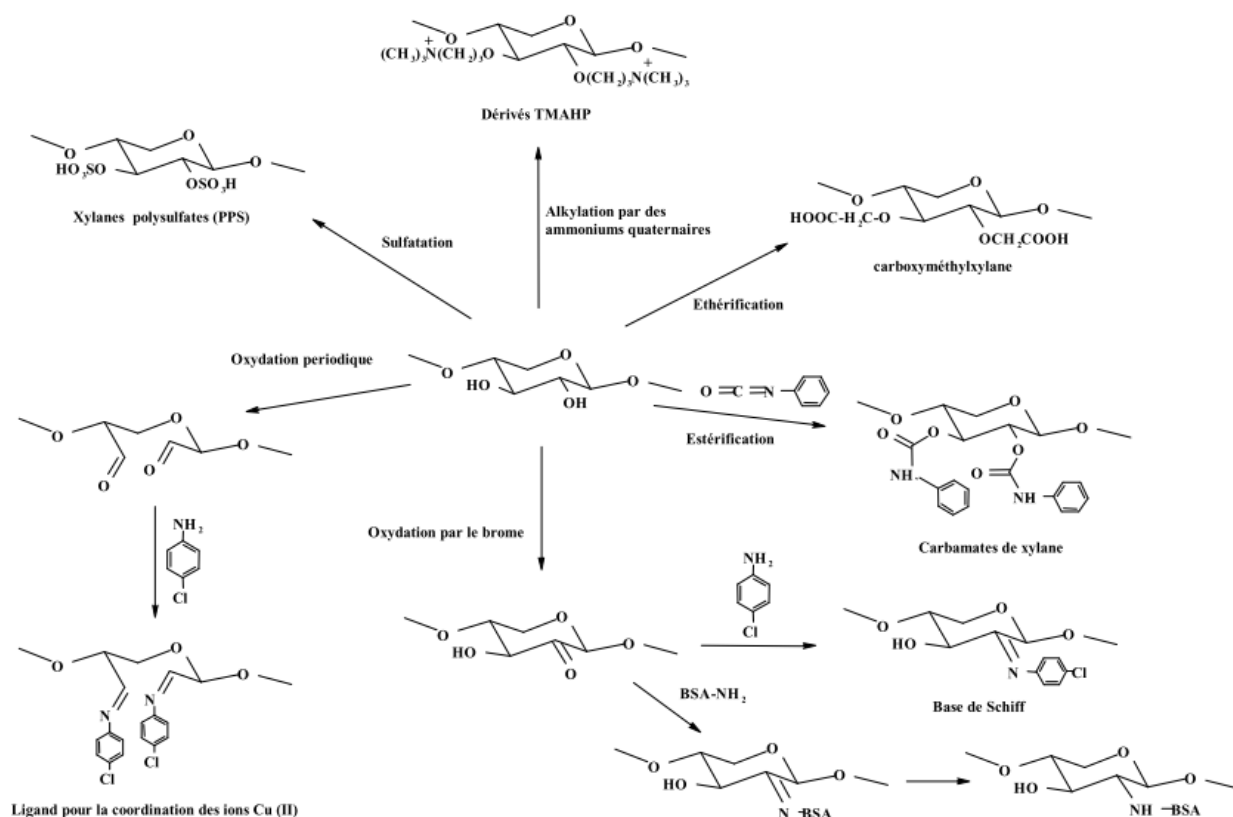


Figure 12. Les dérivatisations classiques des xylanes. Moine, 2005.
Adapté de Ebringerova et Hromadkova, 1999 [59,77]

II.1. Estérification

L'estérification des groupements hydroxyle peut modifier drastiquement les propriétés des xylanes telles que la thermoplasticité, l'hydrophobicité, la biodégradabilité, la solubilité ou encore l'inflammabilité [100]. Les propriétés vont dépendre de la nature de l'agent d'estérification utilisé mais aussi du DS.

- Par addition d'acides carboxyliques, d'anhydrides carboxyliques ou de chlorures d'acyle, il est possible d'introduire de nombreux groupements différents sur la chaîne de xylane [101]. Dans le cas des chlorures, de la triéthylamine est ajoutée pour neutraliser l'acide chlorhydrique libéré lors de l'acylation.

Il est par exemple possible de synthétiser des xylanes cationiques, par réaction avec le chlorure de 3-carboxypropyltriméthylammonium [102]. La réaction est conduite en milieu homogène dans le DMSO, en présence de carbonyldiimidazole (**CDI**) comme activateur (Figure 13).

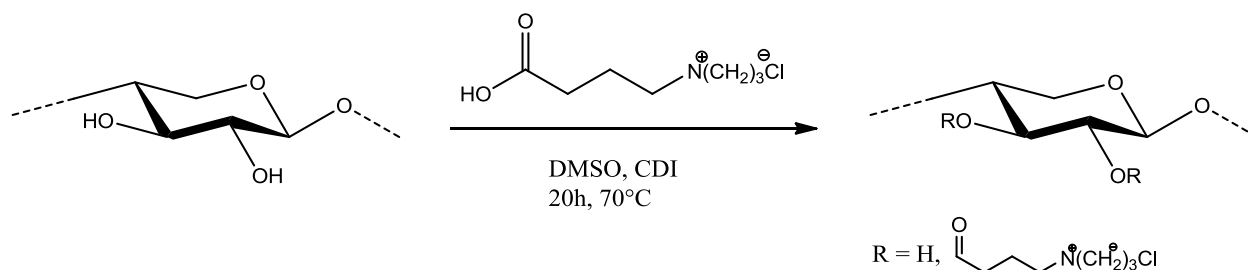


Figure 13. Illustration de l'estérification du xylane avec le chlorure de 3-carboxypropyltriméthylammonium.
 Adapté de Petzold-Welcke et al., 2014 [102]

- La fonctionnalisation du xylane par des groupements carboxyliques est réalisée par addition d'anhydride cyclique, conduisant ainsi à un polymère plus hydrophile et plus soluble dans l'eau (Figure 14). Les systèmes de solvants et de catalyses sont similaires à ceux utilisés pour l'acylation mais les DS obtenus sont généralement inférieurs [103–105].

Citons par exemple l'étude de Tanodekaew *et al.* (2006) portant sur l'estérification de xylanes de hêtre par l'anhydride maléique (**AM**) [106]. La réaction est réalisée dans le DMSO à 50 ou 70°C pendant 2h sous catalyse acide (Figure 14). De façon étonnante, une trop forte température diminue le DS. En effet, à un ratio massique xylane/AM de 2:1, le DS passe de 0,21 à 0,10 pour des températures de 50°C et 70°C respectivement [106]. Ceci pourrait s'expliquer par l'hydrolyse acide voire même la décomposition du xylane par les fonctions acide formées lors de l'ouverture de l'AM.

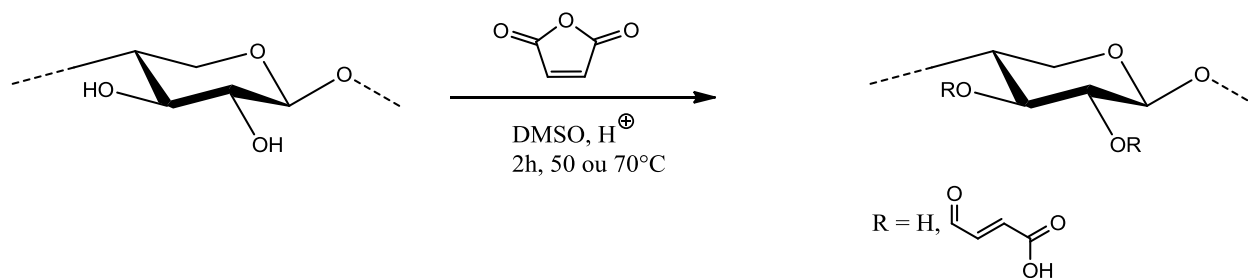


Figure 14. Illustration de l'estérification du xylane par l'anhydride maléique.
 Adapté de Tanodekaew et al., 2006 [106]

- Il est aussi possible de greffer des chaînes grasses (C6 à 18) sur les xylanes. La réaction se fait généralement en milieu homogène dans le diméthylformamide (**DMF**) ou le diméthylacétamide, par des chlorures d'acyle en présence de triéthylamine et d'un catalyseur basique (pyridine, 4-diméthylaminopyridine ou N-bromosuccinimide) [103,107–111].

Une étude de Hansen et Plackett (2011) a par exemple démontré l'efficacité de la succinylation de xylanes de bouleau par des dérivés à chaîne grasse (C8, C12 et C18). La réaction est effectuée en phase homogène dans le chlorure du butyl-3-méthylimidazolium et les effets du temps et de la température de réaction, du nombre d'équivalents de réactif et de la longueur de la chaîne grasse ont été étudiés [112]. Quelle que soit la longueur de la chaîne grasse, des DS de 0,16-0,17 ont été obtenus avec l'utilisation de 0,8 équivalents de réactif (80°C pendant 2h). Une augmentation du temps de réaction à 12h permet d'augmenter le DS à 0,27 mais une décoloration du milieu est observée révélant des réactions secondaires. De la même façon, une augmentation de la température permet d'augmenter le DS (en 30 min de réaction le DS passe de 0,08 pour 80°C à 0,27 pour 100°C) mais une décoloration est aussi observée. Enfin, une augmentation du nombre d'équivalents n'augmente pas le DS, au contraire : en passant de 0,8 à 2,5 équivalents (80°C pendant 2h), le DS diminue de 0,17 à 0,10. Les auteurs mentionnent que c'est contraire à ce qui a pu être observé dans d'autres études mais n'avancent aucune explication [112].

II.2. Ethérification

La réaction d'éthérification transforme les multiples fonctions hydroxyle du xylane en fonctions éther. La liaison éther est alors plus résistante à de *post*-réactions que la liaison ester. De manière générale, la fonction alcool est d'abord activée par de la soude puis l'alcoolate réagit avec l'agent d'éthérification [113]. L'activation des groupements hydroxyle du xylane par la soude, peut entraîner une dépolymérisation partielle du xylane. Pour limiter cette dépolymérisation, la réaction peut être réalisée en solvant organique comme l'éthanol ou le toluène [114]. Lorsque le xylane n'est pas ou peu soluble, la réaction a lieu en milieu hétérogène et le DS obtenu varie alors selon le mélange de solvants utilisé : plus la solubilité augmente, plus

le DS augmente. Le DS varie aussi en fonction de la concentration en soude qui doit être assez élevée pour activer le xylane mais pas trop pour ne pas le dégrader.

L'une des réactions d'étherification la plus connue est la méthylation, utilisée pour rendre les sucres volatils avant analyse en chromatographie en phase gazeuse (GC). Elle est classiquement réalisée dans le DMSO avec un halogénure de méthyle et peut être catalysée par le diméthylsulfoxylate de sodium [115] ou plus efficacement par l'hydroxyde de sodium [116]. La méthylation de polysaccharides, suivie de l'hydrolyse totale des polysaccharides et d'une seconde dérivatisation des sucres obtenus (typiquement acétylation [117] ou silylation [118]), permet aussi par GC une analyse des liaisons glycosidiques. La méthylation des xylanes peut aussi se réaliser avec succès en milieu aqueux avec un halogénure de méthyle en présence de soude. Petzold *et al.* (2008) ont par exemple étudié la méthylation de xylanes de bouleau soit avec du chlorure de méthyle soit avec de l'iodure de méthyle [119]. Un DS maximal de 0,94 a été atteint en utilisant le chlorure de méthyle en excès dans une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 40% et sous pression (3h à 78°C à 12 bar).

L'étherification est aussi beaucoup utilisée pour la synthèse de xylanes ioniques :

- La carboxylation permet l'obtention de xylanes anioniques

Cette réaction a par exemple été étudiée par Petzold *et al.* (2006) en utilisant le chloroacétate de sodium dans le 2-propanol (Figure 15).

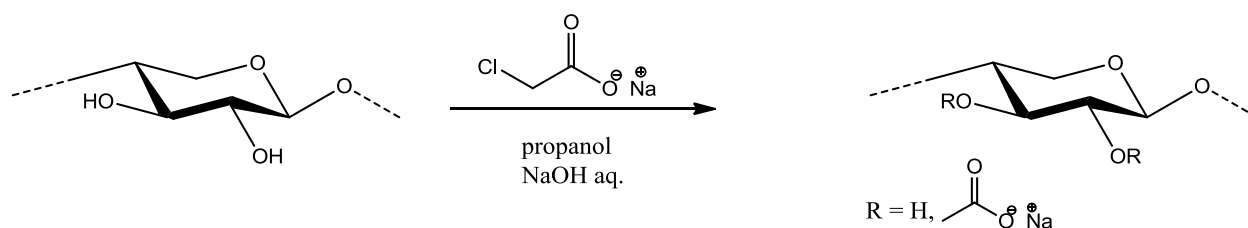


Figure 15. Illustration de l'étherification du xylane par le chloroacétate de sodium.
Adapté de Petzold *et al.*, 2006 [114]

La soude aqueuse a été utilisée comme activateur des alcools avec une concentration optimale de 15%. Il a aussi été montré que le DS augmente avec le nombre d'équivalents de chloroacétate de sodium jusqu'à atteindre un palier autour de 1 [114]. Une technique dépasser ce palier est alors de préalablement dissoudre le xylane dans le milieu aqueux avant d'ajouter le

co-solvant organique, ici le propanol. C'est une technique générale qui peut s'appliquer à toute réaction en milieu hétérogène. Grâce à cette pré-dissolution, le précédent DS maximal de 1 passe à 1,2. Finalement, Petzold *et al.* (2006) ont montré qu'il était possible de considérablement augmenter le DS (de 1,22 à 1,66) en réitérant la même réaction une seconde fois. Il a été observé que dans les mêmes conditions, les DS sont similaires entre différents types de xylanes (MGX, AGX et AX). De plus, la réaction se fait préférentiellement en position 2 [114].

Enfin, cette étude tend à prouver qu'une réaction en milieu hétérogène favorise la distribution en blocs des substituants. En pré-dissolvant les xylanes dans un bon solvant, la réaction est alors réalisée en milieu homogène, conduisant à une uniformisation de la distribution des substituants [114]. Il serait donc possible d'orienter la structure des dérivés du xylane selon le protocole utilisé.

L'éthérification partielle de MGX de hêtre en milieu hétérogène a aussi été étudiée avec le bromure de *p*-carboxybenzyle conduisant à un DS de 0,25. Les MGX ne sont pas dépolymérisés et sont solubles dans l'eau [99,120]. Ces dérivés montrent alors un fort caractère émulsifiant, caractère potentiellement accru par la distribution en blocs des substituants.

- La cationisation des xylanes se fait principalement par deux types d'agents d'éthérification : les dérivés halogénés (Figure 16-a), ou époxydés (Figure 16-c et d). Le DS peut être modifié par la température et le temps de réaction, la concentration en xylane, et les quantités de réactif et de soude utilisées. Bigand *et al.* (2011) ont montré que parmi tous ces paramètres, la concentration en xylane et la quantité de réactif ont le plus d'influence [121]. Comme pour la carboxylation, l'activation des hydroxyles par la soude peut entraîner une dépolymérisation et la réaction peut être réalisée en solvant organique comme les alcools [122] ou le DMSO [123].

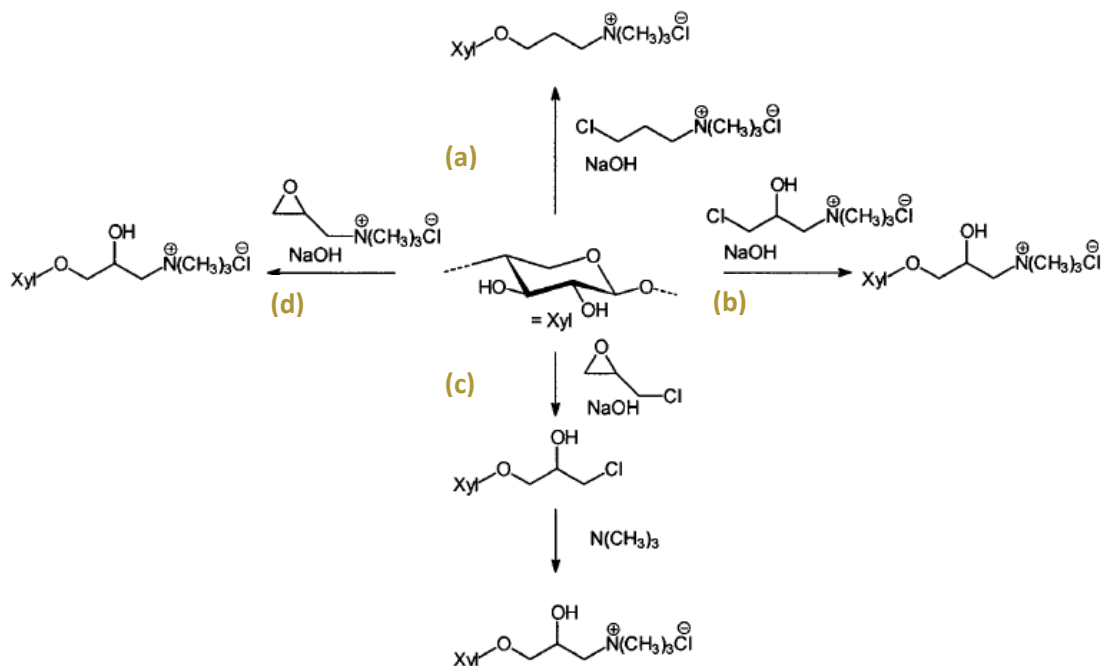


Figure 16. Introduction de groupements cationiques sur les xylanes. Adapté de Ebringerova et al., 2005 [9]

La cationisation de xylanes de hêtre a, par exemple, été étudiée par Simkovic *et al.* (2014). La réaction, effectuée avec 2 équivalents de chlorure de 2,3-époxypropyltriméthylammonium (**EPTA**) en milieu aqueux (NaOH 20 mol.%) pendant 7h à 60°C, conduit à un DS de 0,55 [124].

La cationisation avec l'EPTA peut aussi être réalisée en milieu hétérogène (mélange soude aqueuse à 4% et 1,2-diméthoxyéthane à 1:1,5 comme solvant). Dans des conditions douces (à 24°C pendant 24h), des DS pouvant atteindre jusque 1,64 ont été obtenus par Schwikal *et al.* (2006) avec l'ajout de 10 équivalents d'EPTA [125]. Les dérivés de xylanes obtenus sont alors très hygroscopiques.

Le chlorure de 3-chloro-2-hydroxypropyltriméthylammonim (**chloro-HPTA**) (Figure 16-b) a aussi été utilisé par Ebringerova *et al.* (1994), mais dans ce cas, l'époxyde est généré *in situ* en présence de soude par libération d'acide chlorhydrique. Dans des conditions similaires à l'utilisation d'EPTA mais en utilisant le chloro-HPTA des DS faibles allant de 0,1 à 0,5 ont été obtenus [126]. La formation *in situ* de l'époxyde serait donc l'étape limitant l'efficacité de la réaction [127].

Finalement, l'éthérisation est aussi une réaction possible pour le greffage de longues chaînes carbonées sur des polysaccharides. Par exemple, la réaction de MGX de hêtre avec le 1-bromododecane a été réalisée, par Ebringerova *et al.* (1998), dans le DMSO à température modérée [128]. Cette réaction nécessite l'utilisation d'un solvant organique type isopropanol, acétone ou DMSO et a donc principalement lieu en milieu hétérogène puisque le polysaccharide n'y est *a priori* pas soluble.

II.3. Sulfatation

Les agents sulfatant couramment employés sont l'acide sulfurique, le trioxyde de soufre et l'acide chlorosulfonique (Figure 17). Ces agents peuvent être combinés à des solvants de sulfatation type alcools, amines ou hydrocarbures chlorés [9].

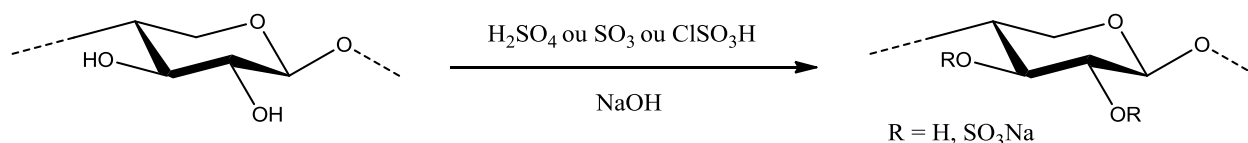


Figure 17. Illustration de la sulfatation du xylane. Adapté de Ebringerova et Hromadkova, 1999 [59]

Une étude de Daus *et al.* (2011) développe la sulfatation de xylanes de hêtre en phase homogène en solvant DMF/LiCl *via* les complexes SO_3/DMF ou $\text{SO}_3/\text{pyridine}$ [129]. Le DS maximal de 1,9 a été atteint sur les xylanes purifiés par l'utilisation de 3 équivalents du complexe $\text{SO}_3/\text{pyridine}$ pendant 3h à 50°C. Une autre étude de Simkovic *et al.* (2014) a atteint la sulfatation totale de xylanes de hêtre (DS = 2) par l'emploi de ce même complexe $\text{SO}_3/\text{pyridine}$ mais à 5 équivalents, dans le DMF pendant 12h à 60°C [124]. En diminuant le temps de réaction à 6h et le nombre d'équivalents du complexe à 2,5, le DS passe à 0,7. Hettrich *et al.* (2006), quant à eux, ont montré qu'en augmentant la quantité de réactifs de 1 à 3 équivalents, le DS passe de 0,70 à 1,97 (étude réalisée sur des xylanes d'avoine par l'acide sulfamique dans le DMSO à 80°C pendant 3h) [11]. Le DS peut donc être contrôlé en variant la quantité de réactif sulfatant. Il semblerait néanmoins que les valeurs de DS qu'il est possible d'atteindre vont également dépendre de la structure des xylanes étudiés.

II.4. Oxydation

Les xylanes peuvent être oxydés par les oxydes d'azote, l'ion permanganate, le brome, ou encore l'ion periodate. Il existe par exemple une procédure en deux étapes utilisant HIO_4 et NaClO_2 , conduisant à des dérivés 2,3-dicarboxyliques [130]. Il est aussi possible d'oxyder préférentiellement la position 2 en utilisant une solution de brome [131]. Les propriétés physico-chimiques des dérivés oxydés sont fortement dépendantes des réactifs oxydants et des conditions opératoires. L'oxydation avec l'ion periodate présente la particularité d'être hautement sélective et de permettre l'ouverture du cycle formé par le xylose. Ainsi, alors que la plupart des autres techniques d'oxydation conduisent à la formation de nombreux sous-produits, l'utilisation de periodate de sodium ou de potassium permet d'avoir un meilleur contrôle de la réaction et de limiter la génération de sous-produits. L'oxydation au periodate de sodium sera choisie dans la suite de l'étude.

Oxydation au periodate de sodium

L'ion periodate oxyde les groupements hydroxyle vicinaux présents sur les carbones 2 et 3 du motif xylose du xylane. Deux aldéhydes sont alors formés et un ion iodate est libéré. Cette attaque conduit à la rupture de la liaison entre ces deux carbones, ouvrant ainsi le cycle pyranosique (Figure 18). Dans cette réaction, un ion periodate est consommé par unité répétitive du polymère. Le degré d'oxydation (**DO**) du xylane est de ce fait directement relié au taux de periodate présent dans la solution. La quantité d'ions periodates ajoutée est donc un paramètre clé dans le contrôle de l'oxydation.

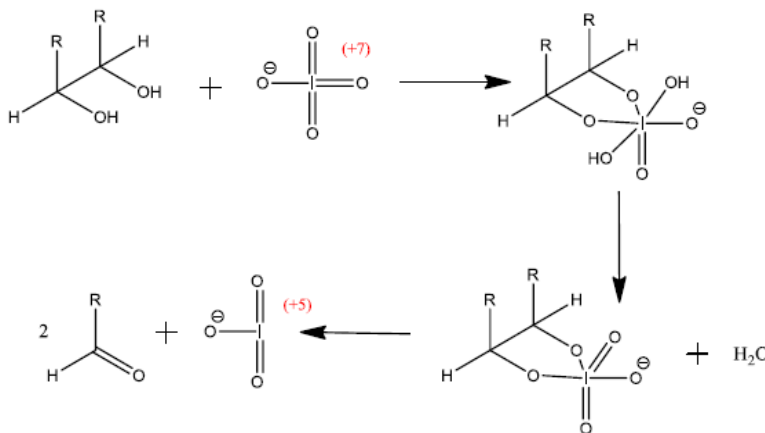


Figure 18. Coupure oxydante des 1,2 diols par l'ion periodate

L'intérêt principal de l'oxydation des xylanes par l'ion periodate est sa simplicité de mise en œuvre. Cette réaction ne nécessite pas de système complexe et le solvant utilisé est l'eau. De plus, elle consomme peu d'énergie puisque la réaction se déroule à température ambiante. Les ions periodate sont très sensibles aux rayonnements ultraviolets, aussi il est nécessaire de pratiquer la réaction d'oxydation dans l'obscurité. Les xylanes sont dissous dans l'eau dans des proportions pouvant aller de 5 à 30 g/L, puis mélangés à la solution de periodate. C'est une réaction assez lente de plusieurs heures à température ambiante, typiquement entre 5 et 24h. Afin d'arrêter la réaction, l'excès de periodate est mis à réagir avec un diol tel que l'éthylène glycol [131].

Un autre intérêt est de pouvoir contrôler le DO en variant le taux de periodate. Néanmoins, un trop fort taux de periodate peut conduire à la formation de sous-produits, voire même à la dégradation du produit désiré. Fredon *et al.* (2002) ont par exemple étudié l'influence du taux de periodate - 20, 50, 100 et 200 mol.% - sur l'oxydation de xylanes de son de maïs et ont montré qu'à forts taux de periodate, les groupements aldéhyde formés par l'oxydation des groupements hydroxyle peuvent être à leur tour oxydés en acides carboxyliques (Figure 19). Cette sur-oxydation conduit à la formation de fonctions réactives non voulues ainsi qu'à la libération d'acide formique, et consomme du periodate, limitant ainsi l'oxydation des fonctions hydroxyle restantes [132].

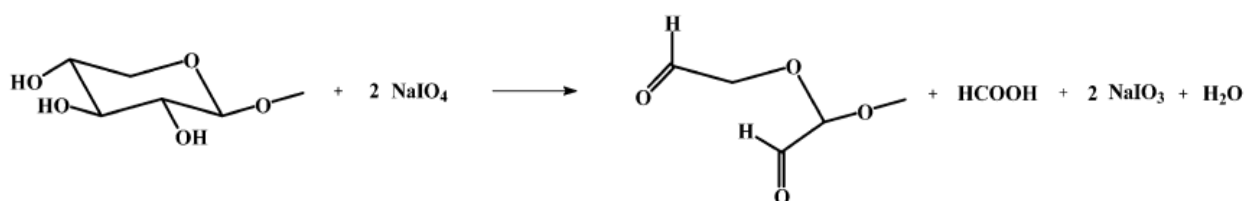


Figure 19. Illustration de la suroxydation au periodate sur l'extrémité non-réductrice du xylane (Fredon *et al.*, 2002 [132])

Par ailleurs, plusieurs études ont montré que l'oxydation au periodate peut entraîner une diminution conséquente de la masse molaire du polymère [133]. Vold *et al.* (2006) ont étudié l'oxydation au periodate des alginate à 44 mol.% et ont observé une chute des valeurs de masses molaires de 260 000 g/mol à 48 000 g/mol [134]. Cette dépolymérisation a été attribuée à la formation de radicaux libres due à la décomposition du periodate. En effet, bien que le milieu réactionnel soit plongé dans l'obscurité, les ions periodate restent instables, notamment

lorsque la réaction est longue. La décomposition des ions libère des radicaux libres qui peuvent attaquer les liaisons internes du polymère et ainsi provoquer sa dégradation. L'addition de n-propanol au mélange est un moyen efficace de réduire la réactivité des radicaux vis-à-vis de la chaîne polymère. Les observations ont principalement été faites sur la cellulose et les alginates mais peuvent s'appliquer aux xylanes.

Après avoir été développée pour l'analyse structurale des polysaccharides, l'oxydation au periodate est maintenant vue comme un moyen de valorisation efficace des hémicelluloses. Leurs dérivés oxydés pouvant par exemple servir de base à l'élaboration de nouveaux matériaux fonctionnels. Des films hydrophobes ont par exemple été obtenus par Fredon *et al.* (2002) par l'oxydation contrôlée des xylanes de son de maïs au periodate de sodium suivie de l'amination réductrice avec la laurylamine [132]. Les DS varient entre 0,5 et 1,1 selon les conditions d'oxydation, la Tg des polymères obtenus est alors autour de -30°C.

Propriétés physico-chimiques des xylanes oxydés

L'ouverture du cycle au niveau de la liaison entre les carbones C2 et C3 entraîne une grande augmentation de la mobilité des chaînes. La longueur de persistance (P) d'un polymère est la distance à partir de laquelle il n'existe plus de corrélation entre les orientations de deux segments de la chaîne. Plus cette valeur est élevée, plus le polymère est rigide. Dans le cas des alginates, la valeur de P passe de 12 nm avant oxydation à 4 nm pour un taux d'oxydation de 40 mol.% [135]. La chaîne devient donc beaucoup plus flexible, et a tendance à adopter des structures plus compactes, la rendant plus difficile à solubiliser. De plus, des héli-acétals intra- et intermoléculaires peuvent se former après oxydation. Les liaisons intermoléculaires conduisent à la formation d'un réseau physique ayant pour effet de diminuer la solubilité [136].

La viscosité intrinsèque du matériau diminue également. Dans le cas des alginates, pour une même masse molaire, une viscosité trois fois moins élevée a été observée pour le dérivé oxydé comparée à celle de l'alginate non-oxydé [77].

III. Autres modifications chimiques des xylanes

D'autres modifications des xylanes, comme, l'amination réductrice, la copolymérisation ou la réticulation permettent d'accéder à de nouveaux matériaux avec différentes propriétés.

L'extrémité réductrice du xylane est en équilibre entre sa forme ouverte et sa forme fermée (Figure 20), et dispose donc d'une fonction aldéhyde disponible en forme ouverte. Cette fonction spécifique permet de fonctionnaliser le xylane de manière sélective par amination réductrice et ainsi d'envisager des morphologies de type 'bloc'.

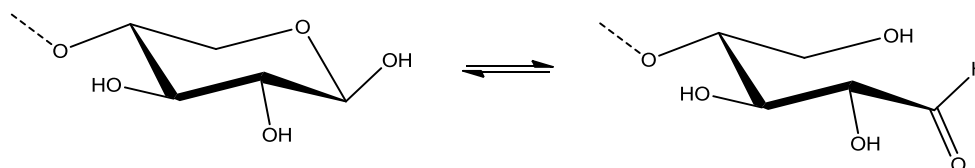


Figure 20. Equilibre entre les formes ouverte et fermée de l'extrémité réductrice des xylanes

La copolymérisation du xylane avec d'autres polymères – synthétique ou naturel – permet de combiner leurs propriétés respectives – biologique ou physicochimique – pour former un nouveau matériau polymère. Pour cela, il existe deux méthodes, le '*grafting from*' qui consiste à d'abord greffer les monomères puis à les polymériser ou le '*grafting onto*' qui consiste à coupler directement le copolymère sur le xylane. L'amination réductrice peut notamment servir d'outils au '*grafting onto*'. Il est alors possible d'accéder à des morphologies de type 'bloc' ou en 'peigne', en utilisant les fonctions hydroxyle de la chaîne. La copolymérisation du xylane conduit souvent à la réticulation du matériau, qui devient insoluble dans l'eau ou dans d'autres solvants organiques. Le gonflement de ce réseau dans l'eau conduit à l'obtention de gels.

III.1. Amination réductrice

L'amination réductrice est une réaction bien connue de l'extrémité réductrice des polysaccharides [137–139]. Cette réaction spécifique permet de fonctionnaliser le xylane de manière sélective par son extrémité réductrice (Figure 21) et conduit à la modification des xylanes par une large palette de fonctions selon la nature du groupement introduit. Cette réaction consiste en l'attaque nucléophile d'une amine libre (amine primaire, oxime ou hydrazone) sur un carbonyle protoné (aldéhyde ou cétone) en milieu acide. En comparaison à d'autres polysaccharides, la fonctionnalisation des xylanes par amination réductrice a été peu

étudiée. Dans cette partie, l'amination de tout type de polysaccharides dont les conditions peuvent aisément se transposer aux xylanes sera donc traitée.

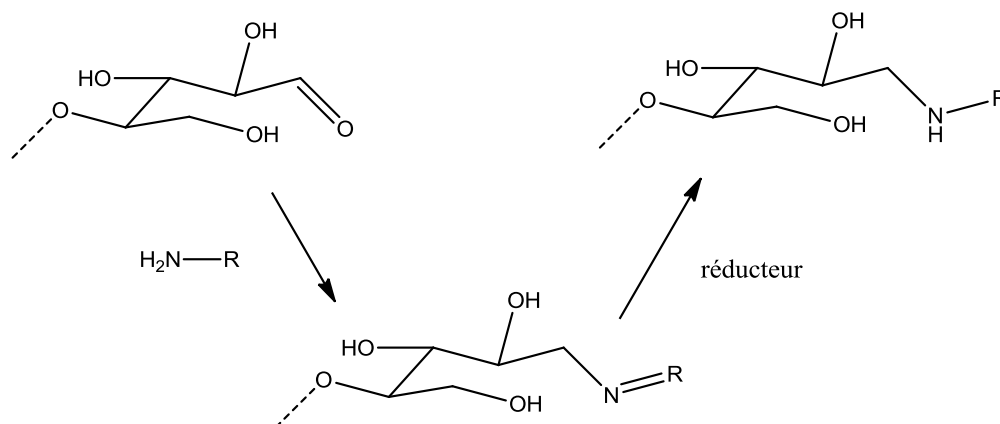


Figure 21. Amination réductrice de l'extrémité réductrice du xylane

L'avantage incontesté de cette réaction est son milieu réactionnel, l'eau. Les autres paramètres tels le pH, le réducteur utilisé, la durée de réaction ou la température varient d'une étude à l'autre, notamment suivant le polysaccharide utilisé mais aussi l'amine [132,137–139]. De manière générale, le polysaccharide est solubilisé dans l'eau à des concentrations allant de 1 à 30 g/L. L'amine est ensuite ajoutée en excès, son nombre d'équivalents étant typiquement de 5 mais pouvant atteindre 75 dans certaines études. Suivant le réducteur utilisé, ce dernier est ajouté directement (NaBH_3CN) ou après (NaBH_4) avoir laissé le mélange réactionnel sous agitation pendant 24h à température ambiante. En effet, NaBH_4 n'étant pas sélectif, il faut d'abord réaliser l'amination avant la réduction pour ne pas risquer la réduction des aldéhydes. Par contre NaBH_3CN est un réducteur sélectif des imines, il est alors possible de faire l'amination et la réduction 'one pot' ; ce dernier est donc beaucoup plus approprié. Dans tous les cas, le réducteur est, lui aussi, ajouté en excès avec un nombre d'équivalents similaire à celui utilisé pour l'amine. A ce moment de la réaction, le pH peut être ajusté à 6-7 ou non modifié. Il est aussi possible de réaliser la réaction dans un tampon, par exemple de type acétate à pH 5-6. La réaction est ensuite laissée plusieurs heures sous agitation à température ambiante, typiquement 24h. Les rendements de réaction sont en général de l'ordre de 70 wt.%.

L'amination réductrice connaît des limites : c'est une réaction lente et rarement totale. Ceci est d'autant plus vrai lorsque les polysaccharides utilisés sont de grande taille. Il est alors possible

de réaliser la réaction à 50°C et sur plusieurs jours [137], ou encore d'utiliser un catalyseur comme l'aniline [139]. De plus, si l'amine n'est pas soluble dans l'eau il est possible de la solubiliser au préalable dans un autre solvant miscible à l'eau tel que le DMSO, puis de faire l'amination réductrice dans un mélange eau/DMSO [140].

Par ailleurs, l'amination réductrice peut aussi se faire sur les groupements aldéhyde produits par l'oxydation au periodate de sodium des xylanes (Partie B, II.5), et conduire ainsi à des xylanes greffés. Fredon *et al.* (2002) ont étudié cette approche sur des xylanes de son de maïs en y greffant de la dodécylamine [132].

III.2. Copolymérisation 'grafting from'

La copolymérisation 'grafting from' a principalement été utilisée pour la synthèse d'hydrogels. Citons par exemple les études de Lindblad sur des galactoglucomannanes en 2001 et 2005 puis de Fonseca Silva sur des xylanes en 2011 [141–143].

Ces différentes études font appel à la polymérisation radicalaire après avoir fonctionnalisé le xylane avec le méthacrylate d'hydroxyéthyle (**HEMA**). La première étape d'estérification a lieu dans le DMSO à 45-50°C avec l'**HEMA-Im** comme réactif et la triéthylamine comme catalyseur (Figure 22). La réaction est alors aidée par l'imidazole qui est un bon groupe partant [144]. L'**HEMA** est donc préalablement activé par réaction avec le carbonyldiimidazole (**CDI**) (synthèse de l'**HEMA-Im** présentée Figure 23).

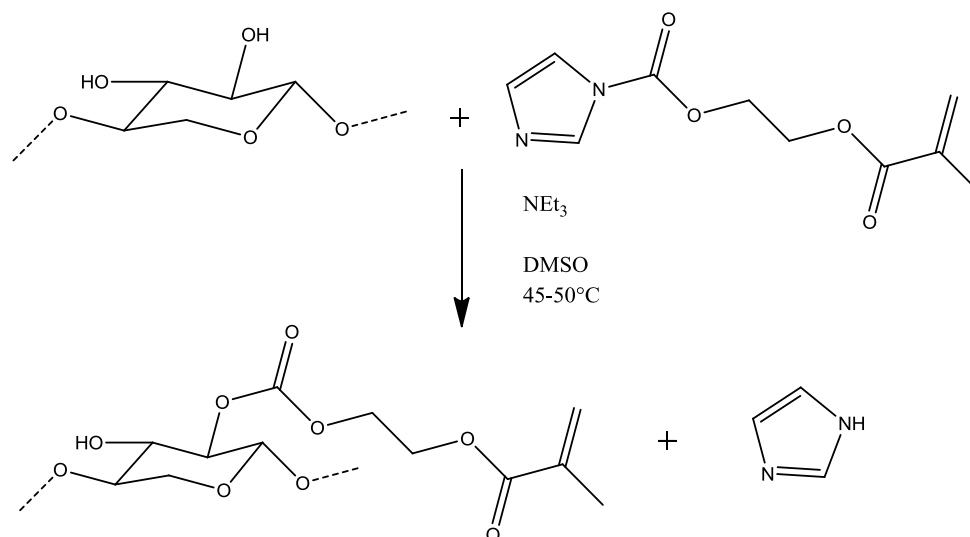


Figure 22. Estérification du xylane par l'**HEMA-Im**. Adapté de Lindblad *et al.*, 2005 [143]

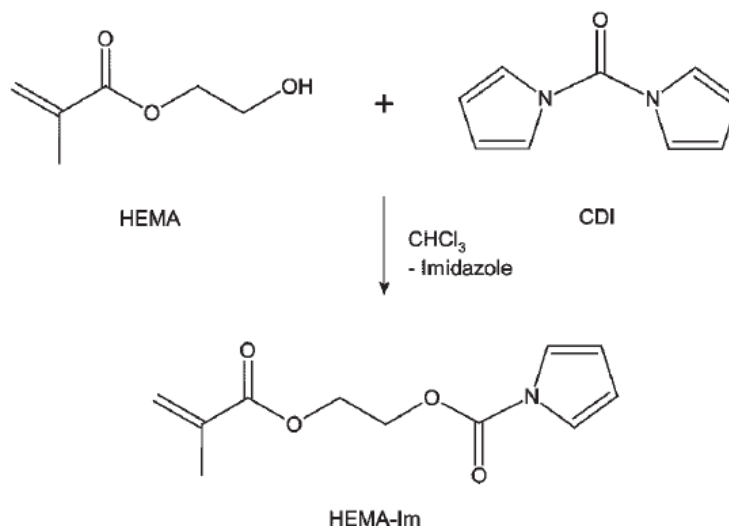


Figure 23. Synthèse de l'HEMA-Im par réaction du CDI sur l'HEMA (Ranucci et al., 2003 [145])

Pour obtenir différents DS, il est évidemment possible de faire varier le taux d'HEMA-Im mais Fonseca Silva *et al.* (2011) ont montré qu'à un même taux d'HEMA-Im, la durée de réaction permettait aussi de contrôler le DS. Le DS est autour de 0,1 après 6h pour atteindre son maximum d'environ 0,5 après 24h. L'augmentation du DS est linéaire avec le temps de réaction. Il a aussi été montré que la présence de groupements acétyle gêne la fonctionnalisation car des positions –OH sont déjà occupées mais aussi à cause de l'encombrement stérique. Dans les mêmes conditions, mais sur un xylane acétylé, le DS maximum de 0,2 environ est atteint après 72h. Il est aisé de comprendre l'importance du DS puisqu'il conditionne le nombre de points de jonction du futur réseau. Notons que l'augmentation du DS permet l'augmentation de la densité du gel mais n'a aucun effet sur le pouvoir absorbant du gel final [141].

La seconde étape correspond au 'grafting from' avec la synthèse d'un réseau par polymérisation radicalaire soit de l'HEMA soit de tout autre méthacrylate. La polymérisation est réalisée dans l'eau en présence d'un système amorceur redox (peroxodisulfate d'ammonium et pyrosulfite de sodium entre 0,2 et 0,8%). La solution est agitée puis placée dans un contenant adapté à la formation d'un gel. Pour obtenir le gel, le mélange est soit laissé à température ambiante pendant 6h [141] soit à 40°C pendant 3h [143]. Cette seconde étape peut aussi servir à moduler les propriétés du réseau final en variant le ratio xylane/HEMA. Fonseca Silva *et al.* (2011) ont par exemple étudié deux ratios xylane/HEMA, à savoir 40:60 et 60:40, et ont montré qu'un ratio en

HEMA plus faible permet d'accroître le pouvoir absorbant de l'hydrogel (de 10% entre les ratios 60:40 et 40:60). A l'inverse, l'influence du ratio xylane/HEMA sur le taux de gonflement est négligeable. C'est le DS initial qui a une grande influence sur le taux de gonflement, qui augmente lorsque le DS diminue.

Une autre approche consiste à faire le tout '*one pot*'. Zhang *et al.* (2014) ont réalisé des copolymères xylane greffé par des polycaprolactones (**PCL**) par ouverture de cycle de la caprolactone (**CL**) par les hydroxyles du xylane [146]. Ils ont utilisé un système homogène DMSO/LiCl servant à la fois, de solvant, de base de Lewis et de catalyseur. Le xylane est solubilisé à environ 20 g/L dans le DMSO contenant 6 wt.% de LiCl. La réaction est conduite à 100°C pour des temps de réaction et des ratios CL/xylane variables. Les auteurs montrent qu'une augmentation du temps de réaction ou du ratio CL/xylane, conduit à une augmentation à la fois du DS et de la taille des PCL. Par exemple, pour une réaction de 24h, un ratio 1 :1 conduit à un DS de 0,04 avec 3,34 wt.% de PCL alors qu'un ratio de 20 :1 conduit à un DS de 0,39 avec 25,20 wt.% de PCL. Le DS maximal de 0,39 atteint dans cette étude reste faible malgré la grande quantité de CL utilisé (20 :1).

Outre la formation d'hydrogels, la méthode '*grafting from*' a été utilisée par Enomoto-Rogers et Iwata (2013) pour la synthèse de copolymères triblocs à base de xylanes et de poly(acide lactique) (**PLA**) : PLA-*b*-xylane-*b*-PLA, selon la méthodologie illustrée Figure 24 [147]. Après modifications en 3 étapes, les xylanes ne possèdent plus que deux fonctions hydroxyle aux extrémités (Figure 24-3) et servent alors de macro-amorceurs. Différents nombres d'équivalents d'acide lactique ont alors été polymérisés en masse avec un catalyseur métallique (Sn(Oct)₂): 100, 260 et 560 équivalents. Le copolymère triblocs a été obtenu en mélange avec de l'homoPLA et l'effet des copolymères triblocs sur la cristallisation du PLA a été étudié : la présence du copolymère améliore la cristallisation du PLA à 90°C et sert d'agent de nucléation [147].

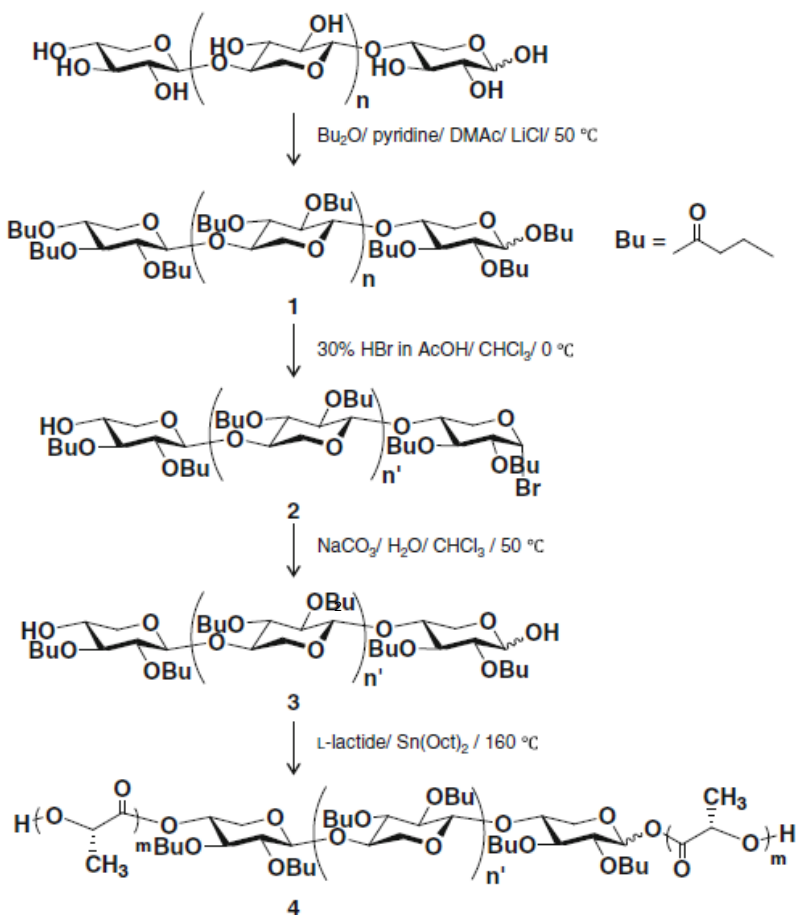


Figure 24. Méthodologie en 4 étapes pour la synthèse de copolymères triblocs PLA-xylane-PLA (Enomoto-Rogers et Iwata, 2013 [147])

III.3. Copolymérisation ‘grafting onto’

Globalement, cette méthode a été moins étudiée que la précédente. En effet, le couplage d’un polymère sur une chaîne de xylane conduit à de faibles DS en raison de l’encombrement stérique.

Tanodekaew *et al.* (2006) ont étudié le greffage de poly(alcool vinylique)s sur des xylanes (**PVA**) [106]. Le PVA (30 000 – 70 000 g/mol) est couplé au xylane *via* l’anhydride maléique dans le DMSO à 70°C pendant 4 h. Différents ratios xylane/PVA ont été étudiés et l’augmentation de la quantité de PVA de 10 à 45% permet d’augmenter le pouvoir absorbant du copolymère final. Notons que, là encore, la copolymérisation conduit à un réseau tridimensionnel et s’avère être une méthode de réticulation par voie chimique. L’équipe de Lindblad (2001 et 2005) a également utilisé cette méthode pour la préparation de gels galactoglucomannanes-polyHEMA

[142,143]. Les auteurs ont greffé du polyHEMA à 6 unités par réaction dans l'eau à 40°C pendant 3h et il s'est avéré que la capacité d'absorption des hydrogels formés était supérieure à celle des hydrogels obtenus par 'grafting from'.

Enomoto-Rogers et Iwata (2012) ont utilisé le 'grafting onto' pour la synthèse de copolymères xylane-*g*-PLA selon la méthodologie illustrée Figure 25 [148]. Trois blocs PLA de tailles différentes ont été greffés sur le xylane (\overline{DP}_n 51) : PLA₄₀, PLA₇₅ et PLA₁₅₁, et pour chaque \overline{DP}_n , 5 nombres d'équivalents PLA/unité xylose ont été étudiés : 1/8, 1/4, 1/2, 1/1 et 2/1.

Dans le cas du PLA₇₅, une grande quantité de PLA₇₅ ne réagit pas sauf dans le cas du ratio 1/8. Dans ce cas particulier, la conversion est totale est le DS a été estimé à 8,8. Les chaînes de PLA jouent alors un rôle plastifiant : la Tg du xylane fonctionnalisé avant ajout de PLA de 111,2°C chute à 54,0°C [148].

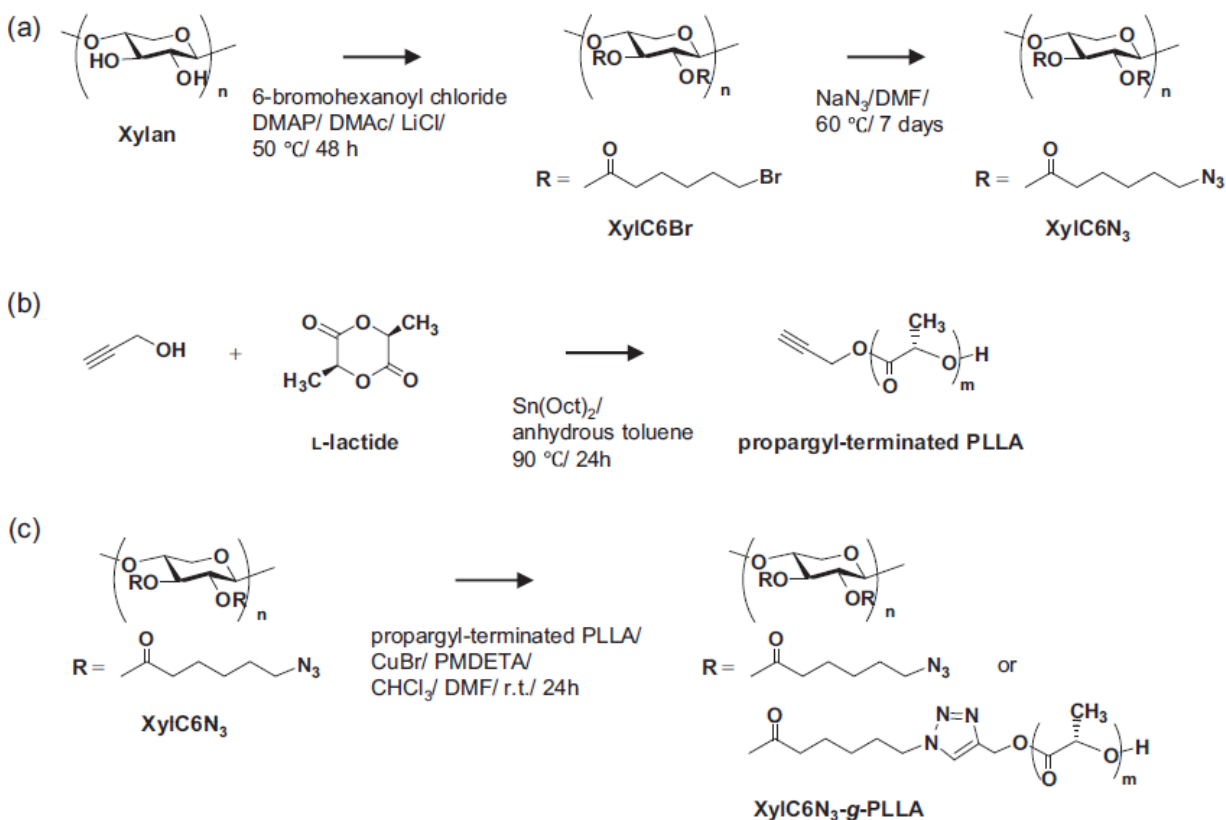


Figure 25. Préparation du xylane fonctionnalisé azoture (a), du poly(acide lactique) terminé par une fonction allyle (b) et du copolymère obtenu par couplage des deux blocs (c) (Enomoto-Rogers et Iwata, 2012 [148])

III.4. Méthodes de réticulation

En plus des méthodes de copolymérisation déjà décrites précédemment qui permettent la formation de réseaux, d'autres méthodes de réticulation existent. Il existe deux voies de réticulation des xylanes, la voie enzymatique et la voie chimique. La voie chimique, qui nous intéresse le plus pour ce travail, n'a été que peu étudiée.

Rozie *et al.* (1992) ont utilisé l'épichlorhydrine comme agent de réticulation [149]. D'un côté, les groupements hydroxyle du xylane viennent ouvrir le cycle époxy, de l'autre le chlore est un bon groupe partant et une substitution nucléophile libérant de l'acide chlorhydrique se produit. Récemment, Luo et Li (2014) ont aussi utilisé l'épichlorhydrine comme agent de réticulation mais après avoir étherifié les xylanes avec de l'acide chloroacétique (catalyse basique) [113]. Cette réticulation en deux étapes offre l'avantage de modifier les propriétés du réseau par son nombre de points de réticulation en contrôlant le DS de l'étape d'éthérification.

Salam *et al.* (2011) ont, quant à eux, utilisé l'acide citrique comme agent de réticulation dans le but d'incorporer des fonctions carboxylique et ainsi augmenter la capacité du réseau à absorber l'eau [150]. L'estérification des hydroxyles des xylanes par les fonctions acide carboxylique du réticulant peut être catalysée par l'hypophosphite de sodium et réalisée en conditions 'semi-sèches' dans une étuve pour augmenter l'efficacité de la réaction.

IV. Valorisation industrielle des dérivés du xylane

Les xylanes représentent à l'heure actuelle un volume d'exploitation industrielle relativement modeste en comparaison à la cellulose ou l'amidon. Néanmoins ils éveillent une attention grandissante. Comme nous l'avons vu précédemment (Partie A, III), ils peuvent être valorisés à l'état natif ou par bioraffinerie. Voyons maintenant quelles sont les autres applications actuelles ou futures des xylanes après dérivatisation.

IV.1. Applications en papeterie

De manière générale, les succinates de xylanes présentent des propriétés telles qu'une viscosité élevée, un pouvoir épaississant, une faible température de gélatinisation ou encore de bonnes

propriétés filmogènes [11]. Tout comme les carboxyxylanes qui eux présentent diverses propriétés comme épaississant, absorbant ou émulsifiant, ils pourraient être utilisés comme détergents, floculants et adhésifs dans le revêtement du papier. C'est aussi le cas des xylanes cationiques qui sont employés comme additifs dans la fabrication du papier car ils améliorent les propriétés mécaniques du papier [151].

IV.2. Applications biomédicales

Des dérivés ioniques

Les xylanes cationiques présentent une activité antimicrobienne contre les bactéries Gram positif et négatif [152]. L'activité biologique augmente avec le DS et dépend fortement de la structure. En effet, l'arrangement des substituants jouerait un rôle important sur les interactions entre le xylane et la surface de la bactérie [59].

Des dérivés sulfatés

Les poly(sulfate de pentosanes)s (**PPS**), souvent synthétisés à partir de MGX de hêtre, sont connus pour leur caractère anticoagulant [59]. Ce caractère anticoagulant serait comparable à celui de l'héparine, molécule naturellement présente dans l'organisme au niveau des tissus conjonctifs chez l'homme et l'animal, fréquemment utilisée pour son action sur la thrombose [153–155]. De plus, les PPS montrent des activités antivirale et anti-inflammatoire. Les PPS semblent très efficaces pour soulager et traiter les cystites interstitielles [156] et ont beaucoup été étudiés pour leur action sur le HIV [157–160]. Les PPS présentent un caractère antitumoral [161] en bloquant les récepteurs des facteurs de croissance à la surface des cellules tumorales. Les PPS empêcheraient également la formation de calculs rénaux en inhibant la croissance des cristaux d'oxalate [162,163], sans oublier leur action contre l'arthrite [164,165]. Les PPS rencontrent donc un fort développement dans le secteur médical, la synthèse de ces dérivés est protégée par différents brevets comme celui déposé en 1983 par SANOFI [166].

IV.3. Applications alimentaires

Les oligomères de xylane possèdent un grand potentiel comme additif alimentaire, notamment grâce à leurs actions sur la santé. En effet, les XOS présentent de nombreuses propriétés

biomédicales : aider au contrôle du niveau d'ammoniac, réduire les complications liées au diabète, augmenter l'efficacité des enzymes anti-oxydantes, ainsi que des propriétés anti-inflammatoire et antiallergique [74,81]. De plus, les XOS substitués par des acides uroniques possèdent des propriétés antimicrobienne [167].

Les XOS ne sont pas dégradés par l'estomac et peuvent atteindre l'intestin, ce sont des prébiotiques [9,168]. Les prébiotiques sont des substrats potentiels pour l'hydrolyse et la fermentation par les bactéries intestinales. Les XOS agissent comme substrats sélectifs des bifidobacterium, bactéries bénéfiques qui résident dans le côlon, en stimulant leur croissance. Leur action prébiotique est plus prononcée lorsque les XOS contiennent de 2 à 4 unités xylose par chaîne [79–81]. Les XOS ont aussi des propriétés laxatives et pourrait servir à lutter contre les désordres intestinaux (leur dose maximale admissible pour un homme adulte japonais a été estimée à 0,12 g/kg de XOS par ingestion [169]). Tout ceci permet aux XOS d'être utilisés comme ingrédients dans l'alimentation dite fonctionnelle, c'est-à-dire qui apporte des bénéfices physiologiques et/ou qui aide à réduire les risques de maladies chroniques.

En plus de leur bénéfice sur la santé, les XOS ont l'avantage de bénéficier d'un pouvoir sucrant tout en étant non-cariogène et peu calorique. Le xylobiose a, par exemple, un pouvoir sucrant correspondant à 30% de celui du sucrose. Les XOS, contrairement à d'autres oligomères, de fructose par exemple, sont stables sur une grande gamme de pH allant de 2,5 à 8,0 à des températures élevées comme celles de la stérilisation ou de la pasteurisation. Cette stabilité va permettre leur utilisation dans des jus de fruit acides et des produits laitiers [78,80].

C'est au Japon que les XOS ont d'abord été utilisés dans la nourriture [170]. Au début du siècle, environ 60 compagnies utilisaient des XOS sur un total d'une centaine de produits alimentaires. La production de XOS était alors estimée à 650 tonnes/an au Japon, représentant près de la moitié de la production mondiale. Les XOS sont alors vendus entre 17 et 40 €/kg selon leur pureté, ce sont alors les oligosaccharides les plus chers du marché sur environ 13 différents types d'oligomères, dont les oligomères de fructose par exemple, et une augmentation de leur valeur marchande est attendue [78,81,171].

IV.4. Applications comme hydrogel

Des études récentes ont montré que les hydrogels à partir de xylanes pourraient servir à l'encapsulation et au relargage de principes actifs. Dans la plupart des études, les xylanes sont mélangés à d'autres polymères tel que le PVA [106]. Une pré-fonctionnalisation du xylane par des fonctions carboxylique (Partie B, II.1) permet de créer un hydrogel par réaction de ces acides carboxyliques avec les alcools du PVA. Selon la nature de l'agent réticulant et le taux de réticulation, il est possible de faire varier l'hydrophilie du gel, son caractère ionique ou encore sa capacité d'absorption d'eau [11,74].

Récemment, des hydrogels de xylanes d'eucalyptus par copolymérisation avec le méthacrylate d'hydroxyméthyle [141] ont été synthétisés. Ces hydrogels ont été testés pour l'encapsulation et le relargage de doxorubicine, molécule représentative des molécules actives contre le cancer. La molécule est simplement ajoutée au mélange et est encapsulée pendant la synthèse du gel. Il est possible de modifier l'hydrogel et donc son efficacité en modulant le DS ainsi que le taux de co-monomère utilisé lors de la polymérisation (Partie B, III.2). Néanmoins, il semblerait que seul le DS aurait une influence sur l'efficacité de l'encapsulation suivie du relargage : plus le DS diminue, plus l'efficacité augmente [141], tout en conservant un DS suffisamment élevé pour la formation d'un gel stable. Fonseca *et al.* ont aussi montré qu'un hydrogel fait à partir de xylanes acétylés est beaucoup plus efficace qu'un gel fait à partir de xylanes non-acétylés. Dans les mêmes conditions, le relargage de la doxorubicine passe de 60 à 80%.

IV.5. Applications en tant que film

Les premiers films bio-sourcés étaient issus de la cellulose par estérification des groupements hydroxyle. Plus récemment, la valorisation des xylanes par l'obtention de films thermoplastiques a suscité l'intérêt de plusieurs groupes de recherche. Plusieurs études montrent la possibilité de former des films par mélange du xylane avec d'autres polysaccharides : chitosane, fibre de cellulose, glucomannanes ou alcools polyvinyliques [74]. Avec le chitosane par exemple, les films obtenus sont solides et opaques [172,173].

D'autres études montrent la possibilité de former des films par modification des xylanes. Par exemple, l'obtention de films autoportants par réticulation de xylanes de bouleau par estérification avec l'acide-2-furanique, puis l'ajout de N,N-dicarbonyldiimidazole dans le milieu permet la réticulation du polymère [174]. Une autre étude propose la synthèse de films par polymérisation par ouverture de cycle de la caprolactone directement sur le xylane (Partie B, III.2) [146]. Il est aussi possible de former des films par oxydation suivie de l'amination réductrice de xylanes par la dodécylamine [132]. En jouant sur le degré de substitution, il est alors possible de modifier les propriétés des films, puisqu'un DS de 0,34 conduit à la formation de films opaques contre des films transparents pour un DS de 0,72. Plus le DS augmente, plus le comportement plastique des films est observé (T_g entre -30 et 0°C grâce à l'ajout de chaînes grasses agissant comme plastifiant). Des films ont également été obtenus par estérification de xylanes de hêtre par le chlorure d'acide laurique [77]. Les propriétés des films obtenus sont alors similaires à celles de films issus de la cellulose mais inférieures à celles des 'plastiques' usuels, tel le polyéthylène.

Conclusion

Cette étude bibliographique a posé les bases relatives aux xylanes, de leur biosynthèse à leurs propriétés en passant par leur structure et leur rôle au sein de la paroi lignocellulosique. Les principaux travaux relatifs à leur extraction, leur modification chimique et leur valorisation ont aussi été résumés. Depuis quelques dizaines d'années, l'intérêt porté aux hémicelluloses comme ressource renouvelable alternative aux ressources fossiles connaît un véritable essor. Plus particulièrement, la chimie des xylanes bénéficie d'une attention croissante depuis les années 2000.

Ce travail de thèse concerne donc un sujet actuel dont l'objectif est de proposer une nouvelle voie de valorisation aux xylanes de bois feuillus par la synthèse de nouvelles molécules amphiphiles et bio-sourcées.

Dans un premier temps, il est important de caractériser les xylanes utilisés puisqu'il existe une variabilité non négligeable des xylanes de bois feuillus. La caractérisation complète de xylanes de deux différentes sources, le hêtre et le bouleau fera l'objet du chapitre I. Le deuxième chapitre sera consacré à l'optimisation des conditions d'hydrolyse pour la synthèse et la production d'oligomères de xylanes de masse molaire contrôlée. Ces oligomères de xylanes formeront alors la partie hydrophile des molécules amphiphiles finales. Toujours concernant les xylanes, le troisième chapitre traitera de leurs modifications chimiques, par oxydation au periodate et/ou par amination réductrice, afin de les rendre fonctionnels pour des réactions de couplage. Le quatrième chapitre sera consacré à la synthèse de deux blocs hydrophobes dérivés de corps gras ainsi qu'à leurs couplages aux oligomères de xylanes fonctionnalisés. Le cinquième et dernier chapitre traitera de l'étude physico-chimique des oligomères amphiphiles ainsi synthétisés. Leur auto-assemblage dans l'eau et dans le chloroforme ainsi que leurs propriétés tensioactives seront étudiés.

Références

- [1] Fontaine N. Livre blanc sur les énergies. 2003.
- [2] Xu F. Structure, Ultrastructure, and Chemical Composition. In: Sun R-C, editor. Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels, Amsterdam: Elsevier; 2010, p. 9–47.
- [3] Albersheim P, Bauer WD, Keegstra K, Talmadge KW. The structure of the wall of suspension cultured sycamore cells. In: Loewus F, editor. Biogenesis Of Plant Cell Wall Polysaccharides, Academic Press; 1973, p. 117–48.
- [4] Liu C-F, Sun R-C. Cellulose. In: Sun R-C, editor. Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels, Amsterdam: Elsevier; 2010, p. 131–67.
- [5] McCormick CL, Shen TC. NEW CELLULOSE SOLVENT FOR PREPARING DERIVATIVES UNDER HOMOGENEOUS CONDITIONS. Organic Coatings and Plastics Chemistry: Preprints of Papers presented at the Meeting of the Ameri, vol. 45, 1981, p. 335–8.
- [6] Wang H, Gurau G, Rogers RD. Ionic liquid processing of cellulose. Chemical Society Reviews 2012;41:1519–37.
- [7] Swatloski RP, Spear SK, Holbrey JD, Rogers RD. Dissolution of Cellose with Ionic Liquids. JACS 2002;124:4974–5.
- [8] Sixta H, Potthast A, Krottschek AW. Chemical Pulping Processes. In: Wiley-VCH, editor. Handbook of Pulp. H. Sixta, 2008.
- [9] Ebringerová A, Hromádková Z, Heinze T. Hemicellulose. Advances Polymer Science 2005;186:1–67.
- [10] Fengel D, Wegener G. Polyoses (Hemicelluloses). In: Fengel D, editor. Wood : chemistry, ultrastructure, reactions, vol. 23. DE GRUYTER, Berlin: 1989, p. 601–2.
- [11] Hettrich K, Fischer S, Schröder N, Engelhardt J, Drechsler U, Loth F. Derivatization and Characterization of Xylan from Oat Spelts. Macromolecular Symposia 2006;232:37–48.
- [12] Atkins EDT. Three-dimensional structure, interactions and properties of xylans. In: Visser J, Beldman G, Kusters van Someren MA, Voragen AGJ, editors. Xylans and Xylanases, Amsterdam: Elsevier Science; 1992, p. 39–50.
- [13] Bromley JR, Busse-Wicher M, Tryfona T, Mortimer JC, Zhang Z, Brown DM, et al. GUX1 and GUX2 glucuronyltransferases decorate distinct domains of glucuronoxylan with different substitution patterns. The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology 2013;74:423–34.

- [14] Marchessault RH, Liang CY. The infrared spectra of crystalline polysaccharides. VIII. Xylans. *Journal of Polymer Science* 1962;59:357–78.
- [15] Ebringerová A, Heinze T. Naturally occurring xylans structures , isolation procedures and properties. *Macromolecular Rapid Communications* 2000;21:542–56.
- [16] Takahashi N, Koshijima T. Ester linkages between lignin and glucuronoxylan in a lignin-carbohydrate complex from beech (*Fagus crenata*) wood. *Wood Science and Technology* 1988;22:231–41.
- [17] Lam TBT, K L, Stone BA. Primary and secondary walls of grasses and other forage plants: Taxonomic and structural considerations. In: Akin DE, Ljungdahl LG, Wilson JR, Harris PJ, editors. *Microbial and Plant Opportunities to Improve Lignocellulose Utilization by Ruminants*, New York: Elsevier; 1990, p. 43–69.
- [18] Rennie EA, Scheller HV. Xylan biosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology* 2014;26:100–7.
- [19] Stoklosa RJ, Hodge DB. Extraction, recovery, and characterization of hardwood and grass hemicelluloses for integration into biorefining processes. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 2012;51:11045–53.
- [20] Fry SC. Analysis of Cross-Links in the Growing Cell Walls of Higher Plants. In: Linskens H-F, Jackson J, editors. *Plant Fibers SE - 2*, vol. 10, Springer Berlin Heidelberg; 1989, p. 12–36.
- [21] Gorshkova TA, Kozlova L V, Mikshina P V. Spatial structure of plant cell wall polysaccharides and its functional significance. *Biochemistry (Moscow)* 2013;78:836–53.
- [22] Busse-Wicher M, Gomes TCF, Tryfona T, Nikolovski N, Stott K, Grantham NJ, et al. The pattern of xylan acetylation suggests xylan may interact with cellulose microfibrils as a twofold helical screw in the secondary plant cell wall of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 2014;79:492–506.
- [23] Popa V. Hemicelluloses. In: Dumitriu S, Dekker M, editors. *Polysaccharides in Medicine and Biotechnology*, New York: 1996, p. 107–24.
- [24] Teleman A, Lundqvist J, Tjerneld F, Stålbrand H, Dahlman O. Characterization of acetylated 4-O-methylglucuronoxylan isolated from aspen employing ¹H and ¹³C NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research* 2000;329:807–15.
- [25] Da Silva Perez D, Huber P, Janodet A, Soranzo A, Guillemain A, Schelcher M, et al. Impact of the extraction conditions and wood species on the chemical composition of hemicelluloses. *ATIP Association Technique de L'Industrie Papetiere* 2011;65:14–20.

- [26] Jacobs A, Larsson PT, Dahlman O. Distribution of Uronic Acids in Xylans from Various Species of Soft- and Hardwood As Determined by MALDI Mass Spectrometry. *Biomacromolecules* 2001;2:979–90.
- [27] Havlicek J, Samuelson O. Chromatography of oligosaccharides from xylan by various techniques. *Carbohydrate Research* 1972;22:307–16.
- [28] Rosell K-G, Svensson S. Studies of the distribution of the 4-O-methyl-d-glucuronic acid residues in birch xylan. *Carbohydrate Research* 1975;42:297–304.
- [29] Timell TE. The polysaccharides of yellow birch (*Betula lutea*). II. The constitution of the main hemicellulose. *Journal of the American Chemical Society* 1959;81:4989–94.
- [30] Timell TE. Isolation and properties of an O-acetyl-4-O-methylglucurono-xyloglycan from the wood of white birch (*Betula papyrifera*). *Journal of the American Chemical Society* 1960;82:5211–5.
- [31] Pauly M, Gille S, Liu L, Mansoori N, de Souza A, Schultink A, et al. Hemicellulose biosynthesis. *Planta* 2013;1–16.
- [32] Johansson MH, Samuelson O. Reducing End Groups in Birch Xylan and Their Alkaline Degradation. *Wood Science and Technology* 1977;11:251–63.
- [33] Bailey RW, Hassid WZ. XYLAN SYNTHESIS FROM URIDINE-DIPHOSPHATE-D-XYLOSE BY PARTICULATE PREPARATIONS FROM IMMATURE CORNCOBS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1966;56:1586–93.
- [34] Dhugga KS. Biosynthesis of non-cellulosic polysaccharides of plant cell walls. *Phytochemistry* 2012;74:8–19.
- [35] York WS, O'Neill M a. Biochemical control of xylan biosynthesis - which end is up? *Current Opinion in Plant Biology* 2008;11:258–65.
- [36] Mortimer JC, Miles GP, Brown DM, Zhang Z, Segura MP, Weimar T, et al. Absence of branches from xylan in *Arabidopsis* gux mutants reveals potential for simplification of lignocellulosic biomass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107:17409–14.
- [37] Minic Z, Rihouey C, Do CT, Lerouge P, Jouanin L. Purification and Characterization of Enzymes Exhibiting β -D-Xylosidase Activities in Stem Tissues of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 2004;135:867–78.
- [38] Suzuki M, Kato A, Nagata N, Komeda Y. A xylanase, AtXyn1, is predominantly expressed in vascular bundles, and four putative xylanase genes were identified in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Plant and Cell Physiology* 2002;43:759–67.

- [39] Van Heiningen A. Converting a kraft pulp mill into an integrated forest biorefinery. *Pulp and Paper Canada* 2006;107:38–43.
- [40] Banerjee G, Car S, Scott-Craig JS, Hodge DB, Walton JD. Alkaline peroxide pretreatment of corn stover: Effects of biomass, peroxide, and enzyme loading and composition on yields of glucose and xylose. *Biotechnology for Biofuels* 2011;4:1–15.
- [41] Peng F, Peng P, Xu F, Sun R-CC. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. *Biotechnology Advances* 2012;30:879–903.
- [42] Glasser WG, Kaar WE, Jain RK, Sealey JE. Isolation options for non-cellulosic heteropolysaccharides (HetPS). *Cellulose* 2000;7:299–317.
- [43] Shimizu K, Sudo K, Ono H, Ishihara M, Fujii T, Hishiyama S. Integrated process for total utilization of wood components by steam-explosion pretreatment. *Biomass and Bioenergy* 1998;14:195–203.
- [44] Hägglund E, Lindberg B, McPherson J. Dimethylsulfoxide, a solvent for hemicelluloses. *Acta Chemica Scandinavica* 1956;10:1160–4.
- [45] Jacobs A, Lundqvist J, Stålbbrand H, Tjerneld F, Dahlman O. Characterization of water-soluble hemicelluloses from spruce and aspen employing SEC/MALDI mass spectroscopy. *Carbohydrate Research* 2002;337:711–7.
- [46] N'Diaye S, Rigal L. Factors influencing the alkaline extraction of poplar hemicelluloses in a twin-screw reactor: correlation with specific mechanical energy and residence time distribution of the liquid phase. *Bioresource Technology* 2000;75:13–8.
- [47] Baeza J, Freer J. Chemical characterization of wood and its components. In: Hon DNS, Shiraishi N, editors. *Wood and Cellulosic Chemistry*. Marcel Dek, New York: 2001, p. 275–384.
- [48] Jacquemin L, Mogni A, Zeitoun R, Guinot C, Sablayrolles C, Saulnier L, et al. Comparison of different twin-screw extraction conditions for the production of arabinoxylans. *Carbohydrate Polymers* 2014;In Press, Corrected Proof. doi:10.1016/j.carbpol.2014.06.071.
- [49] N'Diaye S, Rigal L, Larocque P, Vidal PF. Extraction of hemicelluloses from poplar, *Populus tremuloides*, using an extruder-type twin-screw reactor: A feasibility study. *Bioresource Technology* 1996;57:61–7.
- [50] Bian J, Peng F, Peng P, Xu F, Sun R-C. Isolation and fractionation of hemicelluloses by graded ethanol precipitation from *Caragana korshinskii*. *Carbohydrate Research* 2010;345:802–9.

- [51] Izydorczyk MS, Biliaderis CG. Influence of structure on the physicochemical properties of wheat arabinoxylan. *Carbohydrate Polymers* 1992;17:237–47.
- [52] Izydorczyk MS, Biliaderis CG. Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers* 1995;28:33–48.
- [53] Izydorczyk MS, Macri LJ, MacGregor AW. Structure and physicochemical properties of barley non-starch polysaccharides - II. Alkali-extractable β -glucans and arabinoxylans. *Carbohydrate Polymers* 1998;35:259–69.
- [54] Gaillard BDE. Separation of linear from branched polysaccharides by precipitation as iodine Complexes. *Nature* 1961;191:1295–6.
- [55] Peng F, Ren J-L, Xu F, Bian J, Peng P, Sun R-C. Fractionation of alkali-solubilized hemicelluloses from delignified populus gansuensis: Structure and properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010;58:5743–50.
- [56] Peng F, Bian J, Ren J-L, Peng P, Xu F, Sun R-C. Fractionation and characterization of alkali-extracted hemicelluloses from peashrub. *Biomass and Bioenergy* 2012;39:20–30.
- [57] Marchessault RH, Settineri WJ. Some comments on the crystallography of xylan hydrate. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Letters* 1964;2:1047–51.
- [58] Garcia RB, Ganter JLMS, Carvalho RR. Solution properties of D-xylans from corn cobs. *European Polymer Journal* 2000;36:783–7.
- [59] Ebringerová A, Hromádková Z. Xylans of industrial and biomedical importance. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 1999;16:325–46.
- [60] Wang H-M, Loganathan D, Linhardt RJ. Determination of the pKa of glucuronic acid and the carboxy groups of heparin by ^{13}C -nuclear-magnetic-resonance spectroscopy. *Biochem Journal* 1991;278:689–95.
- [61] Kohn R, Kovác P. Dissociation constants of D-galacturonic and D-glucuronic acid and their O-methyl derivatives. *Chem Zvesti* 1978;32:478–85.
- [62] Chanliaud E. Extraction, caractérisation et propriétés fonctionnelles des hétéroxylanes de son de maïs. Universités Paris VII, 1995.
- [63] Hashi M, Takeshita T. Antitumor effect of 4-O-methylglucuronoxylan on solid tumor in mice. *Agricultural and Biological Chemistry* 1979;43:951–9.
- [64] Hashi M, Takeshita T. The host-mediated antitumor effect of 4-O-methylglucuronoxylan. *Agricultural and Biological Chemistry* 1979;43:961–7.

- [65] Andersson C, Hodge D, Berglund KA, Rova U. Effect of different carbon sources on the production of succinic acid using metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress* 2007;23:381–8.
- [66] Gírio FM, Fonseca C, Carvalheiro F, Duarte LC, Marques S, Bogel-Lukasik R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology* 2010;101:4775–800.
- [67] Grohmann K, Cameron RG, Buslig BS. Fractionation and pretreatment of orange peel by dilute acid hydrolysis. *Bioresource Technology* 1995;54:129–41.
- [68] Garrote G, Domínguez H, Parajó JC. Mild autohydrolysis: An environmentally friendly technology for xylooligosaccharide production from wood. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 1999;74:1101–9.
- [69] Shallom D, Shoham Y. Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology* 2003;6:219–28.
- [70] Tapin-Lingua S, Meyer V, Petit-Conil M. Biotechnologies dans l'industrie papetière. *Bioprocédés Dans Les Domaines de La Santé, de L'agroalimentaire et de La Chimie* 2008:1–11.
- [71] Bajpai P. *Xylanolytic Enzymes*. Academic P. Elsevier; 2014.
- [72] Almeida JRM, Runquist D, Sánchez Nogué V, Lidén G, Gorwa-Grauslund MF. Stress-related challenges in pentose fermentation to ethanol by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Journal* 2011;6:286–99.
- [73] Olofsson K, Rudolf A, Lidén G. Designing simultaneous saccharification and fermentation for improved xylose conversion by a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology* 2008;134:112–20.
- [74] Deutschmann R, Dekker RFH. From plant biomass to bio-based chemicals: latest developments in xylan research. *Biotechnology Advances* 2012;30:1627–40.
- [75] Holmbom B. Xylitol: A healthy sweetener from birch wood . *Actualite Chimique* 2002:52–3.
- [76] Gandini A, Belgacem MN. Furfural and furanic polymers . *Actualite Chimique* 2002:56–61.
- [77] Moine C. Extraction, caractérisation structurale et valorisation d'une famille d'hémicelluloses du bois - Obtention de matériaux plastiques par modification des xylanes. Thèse de l'Université de Limoges, 2005.
- [78] Otieno DO, Ahring BK. The potential for oligosaccharide production from the hemicellulose fraction of biomasses through pretreatment processes:

- Xylooligosaccharides (XOS), arabinooligosaccharides (AOS), and mannoooligosaccharides (MOS). *Carbohydrate Research* 2012;360:84–92.
- [79] Carvalho AFA, Neto PDO, da Silva DF, Pastore GM. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. *Food Research International* 2013;51:75–85.
- [80] Vázquez MJ, Alonso JL, Domínguez H, Parajó JC. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. *Trends in Food Science & Technology* 2000;11:387–93.
- [81] Moure A, Gullón P, Domínguez H, Parajó JC. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. *Process Biochemistry* 2006;41:1913–23.
- [82] Mäki-Arvela P, Salmi T, Holmbom B, Willför S, Murzin DY. Synthesis of sugars by hydrolysis of hemicelluloses--a review. *Chemical Reviews* 2011;111:5638–66.
- [83] Lai YZ. Chemical Degradation. In: Hon DNS, N S, editors. *Wood and Cellulosic Chemistry*. Marcel Dek, New York: 2001, p. 443–512.
- [84] Kamiyama Y, Sakai Y. Rate of hydrolysis of xylo-oligosaccharides in dilute sulfuric acid. *Carbohydrate Research* 1979;73:151–8.
- [85] Roy N, Timell TE. The acid hydrolysis of glycosides X. Hydrolysis of 2-O-(4-O-methyl- α -D-glucopyranosyluronic acid)-D-xylose and related disaccharides. *Carbohydrate Research* 1968;6:488–90.
- [86] Springer EL. Prehydrolysis of hardwoods with dilute sulfuric acid. *Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development* 1985;24:614–23.
- [87] Fanta GF, Abbott TP, Herman AI. Hydrolysis of wheat straw hemicellulose with trifluoroacetic acid. Fermentation of xylose with *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnology and Bioengineering* 1984;26:1122–5.
- [88] Lavarack BP, Griffin GJ, Rodman D. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. *Biomass and Bioenergy* 2002;23:367–80.
- [89] Zhao X, Zhou Y, Liu D. Kinetic model for glycan hydrolysis and formation of monosaccharides during dilute acid hydrolysis of sugarcane bagasse. *Bioresource Technology* 2012;105:160–8.
- [90] Kumar R, Wyman CE. The impact of dilute sulfuric acid on the selectivity of xylooligomer depolymerization to monomers. *Carbohydrate Research* 2008;343:290–300.

- [91] Lau C-S, Thoma GJ, Clausen EC, Carrier DJ. Kinetic Modeling of Xylose Oligomer Degradation during Pretreatment in Dilute Acid or in Water. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 2014;53:2219–28.
- [92] Liu X, Lu M, Ai N, Yu F, Ji J. Kinetic model analysis of dilute sulfuric acid-catalyzed hemicellulose hydrolysis in sweet sorghum bagasse for xylose production. *Industrial Crops and Products* 2012;38:81–6.
- [93] Duarte L, Silva-Fernandes T, Carvalheiro F, Gírio F. Dilute Acid Hydrolysis of Wheat Straw Oligosaccharides. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2009;153:116–26.
- [94] Yang B, Wyman CE. Characterization of the degree of polymerization of xylooligomers produced by flowthrough hydrolysis of pure xylan and corn stover with water. *Bioresource Technology* 2008;99:5756–62.
- [95] Sun H-J, Yoshida S, Park N-H, Kusakabe I. Preparation of (1→4)-β-d-xylooligosaccharides from an acid hydrolysate of cotton-seed xylan: suitability of cotton-seed xylan as a starting material for the preparation of (1→4)-β-d-xylooligosaccharides. *Carbohydrate Research* 2002;337:657–61.
- [96] Akpinar O, Erdogan K, Bostanci S. Production of xylooligosaccharides by controlled acid hydrolysis of lignocellulosic materials. *Carbohydrate Research* 2009;344:660–6.
- [97] Sternemalm E, Höije A, Gatenholm P. Effect of arabinose substitution on the material properties of arabinoxylan films. *Carbohydrate Research* 2008;343:753–7.
- [98] Abasaheed AE, Lee YY. Inulin hydrolysis to fructose by a novel catalyst. *Chemical Engineering & Technology* 1995;18:440–4.
- [99] Ebringerová A, Alfodi J, Hromádková Z, Pavlov GM, E HS. Water-soluble p - carboxybenzylated beechwood 4- O -methylglucuronoxylan : structural features and properties. *Carbohydrate Polymers* 2000;42:123–31.
- [100] Vincendon M. Xylan derivatives: aromatic carbamates. *Die Makromolekulare Chemie* 1993;194:321–8.
- [101] Belmokaddem F-Z, Pinel C, Huber P, Petit-Conil M, Da Silva Perez D. Green synthesis of xylan hemicellulose esters. *Carbohydrate Research* 2011;346:2896–904.
- [102] Petzold-Welcke K, Schwikal K, Daus S, Heinze T. Xylan derivatives and their application potential - mini-review of own results. *Carbohydrate Polymers* 2014;100:80–8.
- [103] Sun RC, Fang JM, Tomkinson J, Geng ZC, Liu JC. Fractional isolation, physico-chemical characterization and homogeneous esterification of hemicelluloses from fast-growing poplar wood. *Carbohydrate Polymers* 2001;44:29–39.

- [104] Sun R, Sun XF, Bing X. Succinoylation of wheat straw hemicelluloses with a low degree of substitution in aqueous systems. *Journal of Applied Polymer Science* 2002;83:757–66.
- [105] Sun XF, Sun RC, Tomkinson J, Baird MS. Preparation of sugarcane bagasse hemicellulosic succinates using NBS as a catalyst. *Carbohydrate Polymers* 2003;53:483–95.
- [106] Tanodekaew S, Channasanon S, Uppanan P. Xylan/polyvinyl alcohol blend and its performance as hydrogel. *Journal of Applied Polymer Science* 2006;100:1914–8.
- [107] Thiebaud S, Borredon ME. Analysis of the liquid fraction after esterification of sawdust with octanoyl chloride - Production of esterified hemicelluloses. *Bioresource Technology* 1998;63:139–45.
- [108] Fang JM, Sun R, Fowler P, Tomkinson J, Hill CAS. Esterification of wheat straw hemicelluloses in the N,N-dimethylformamide/lithium chloride homogeneous system. *Journal of Applied Polymer Science* 1999;74:2301–11.
- [109] Sun R, Fang JM, Tomkinson J, Hill CAS. Esterification of hemicelluloses from poplar chips in homogeneous solution of N,N-dimethylformamide/lithium chloride. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 1999;19:287–306.
- [110] Sun R, Fang JM, Tomkinson J. Stearoylation of hemicelluloses from wheat straw. *Polymer Degradation and Stability* 2000;67:345–53.
- [111] Sun R, Fang JM, Tomkinson J, Jones GL. Acetylation of wheat straw hemicelluloses in N,N-dimethylacetamide/LiCl solvent system. *Industrial Crops and Products* 1999;10:209–18.
- [112] Hansen NML, Plackett D. Synthesis and characterization of birch wood xylan succinoylated in 1-n-butyl-3-methylimidazolium chloride. *Polymer Chemistry* 2011;2:2010–20.
- [113] Luo ZT, Li HP. Synthesis and characterization of crosslinking etherification bagasse xylan. *Advanced Materials Research* 2014;960-961:204–7.
- [114] Petzold K, Schwikal K, Günther W, Heinze T. Carboxymethyl xylan - Control of properties by synthesis. *Macromolecular Symposia* 2006;232:27–36.
- [115] Hakomori S. A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. *J Biochem Tokyo* 1964;55:205–8.
- [116] Needs PW, Selvendran RR. An improved methylation procedure for the analysis of complex polysaccharides including resistant starch and a critique of the factors which lead to undermethylation. *Phytochemical Analysis* 1993;4:210–6.

- [117] Doares SH, Albersheim P, Darvill AG. An improved method for the preparation of standards for glycosyl-linkage analysis of complex carbohydrates. *Carbohydrate Research* 1991;210:311–7.
- [118] Laine C, Tamminen T, Vikkula A, Vuorinen T. Methylation Analysis as a Tool for Structural Analysis of Wood Polysaccharides. *Holzforschung* 2002;56:607–14.
- [119] Petzold K, Günther W, Kötteritzsch M, Heinze T. Synthesis and characterization of methyl xylan. *Carbohydrate Polymers* 2008;74:327–32.
- [120] Ebringerová A, Hromádková Z, Malovíková A, Sasinková V, Hirsch J, Sroková I. Structure and properties of water-soluble p-carboxybenzyl polysaccharide derivatives. *Journal of Applied Polymer Science* 2000;78:1191–9.
- [121] Bigand V, Pinel C, Da Silva Perez D, Rataboul F, Huber P, Petit-Conil M. Cationisation of galactomannan and xylan hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers* 2011;85:138–48.
- [122] Ren JL, Sun RC, Liu CF, Lin L, He BH. Synthesis and characterization of novel cationic SCB hemicelluloses with a low degree of substitution. *Carbohydrate Polymers* 2007;67:347–57.
- [123] Ren JL, Peng F, Sun RC, Liu CF, Cao ZN, Luo W, et al. Synthesis of cationic hemicellulosic derivatives with a low degree of substitution in dimethyl sulfoxide media. *Journal of Applied Polymer Science* 2008;109:2711–7.
- [124] Šimkovic I, Tracz A, Kelnar I, Uhliariková I, Mendichi R. Quaternized and sulfated xylan derivative films. *Carbohydrate Polymers* 2014;99:356–64.
- [125] Schwikal K, Heinze T, Ebringerová A, Petzold K. Cationic xylan derivatives with high degree of functionalization. *Macromolecular Symposia* 2006;232:49–56.
- [126] Ebringerová A, Hromádková Z, Burchard W, Dolega R, Vorwerk W. Solution properties of water-insoluble rye-bran arabinoxylan. *Carbohydrate Polymers* 1994;24:161–9.
- [127] Ebringerová A, Hromádková Z, Kačuráková M, Antal M. Quaternized xylans: synthesis and structural characterization. *Carbohydrate Polymers* 1994;24:301–8.
- [128] Ebringerová A, Sroková I, Talába P, Kačuráková M, Hromádková Z. Amphiphilic beechwood glucuronoxylan derivatives. *Journal of Applied Polymer Science* 1998;67:1523–30.
- [129] Daus S, Petzold-Welcke K, Kötteritzsch M, Baumgaertel A, Schubert US, Heinze T. Homogeneous sulfation of xylan from different sources. *Macromolecular Materials and Engineering* 2011;296:551–61.

- [130] Matsumura S, Nishioka M, Yoshikawa S. Enzymatically degradable poly(carboxylic acid) derived from polysaccharide. *Die Makromolekulare Chemie, Rapid Communications* 1991;12:89–94.
- [131] Jerez JR, Matsuhira B, Urzúa CC, Urda CC. Chemical modifications of the xylan from *Palmaria decipiens*. *Carbohydrate Polymers* 1997;32:155–9.
- [132] Fredon E, Granet R, Zerrouki R, Krausz P, Saulnier L, Thibault JF, et al. Hydrophobic films from maize bran hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers* 2002;49:1–12.
- [133] Vold IMN, Christensen BE. Periodate oxidation of chitosans with different chemical compositions. *Carbohydrate Research* 2005;340:679–84.
- [134] Vold IMN, Kristiansen KA, Christensen BE. A study of the chain stiffness and extension of alginates, in vitro epimerized alginates, and periodate-oxidized alginates using size-exclusion chromatography combined with light scattering and viscosity detectors. *Biomacromolecules* 2006;7:2136–46.
- [135] Kristiansen KA, Potthast A, Christensen BE. Periodate oxidation of polysaccharides for modification of chemical and physical properties. *Carbohydrate Research* 2010;345:1264–71.
- [136] Veelaert S, Wit D De, Gotlibb KF, Verhe R. The gelation of dialdehyde starch. *Carbohydrate Polymers* 1997;32:131–9.
- [137] Upadhyay KK, Meins JF Le, Misra A, Voisin P, Bouchaud V, Ibarboure E, et al. Biomimetic Doxorubicin Loaded Polymersomes from Hyaluronan-block-Poly(γ -benzyl glutamate) Copolymers. *Biomacromolecules* 2009;10:2802–8.
- [138] Daus S, Elschner T, Heinze T. Towards unnatural xylan based polysaccharides: reductive amination as a tool to access highly engineered carbohydrates. *Cellulose* 2010;17:825–33.
- [139] Guerry A, Bernard J, Samain E, Fleury E, Cottaz S, Halila S. Aniline-Catalyzed Reductive Amination as a Powerful Method for the Preparation of Reducing End-“Clickable” Chitooligosaccharides. *Bioconjugate Chemistry* 2013;24:544–9.
- [140] Alvès M-H, Sfeir H, Tranchant J-F, Gombart E, Sagorin G, Caillol S, et al. Terpene and Dextran Renewable Resources for the Synthesis of Amphiphilic Biopolymers. *Biomacromolecules* 2014;15:242–51.
- [141] Fonseca Silva TC, Habibi Y, Colodette JL, Lucia LA. The influence of the chemical and structural features of xylan on the physical properties of its derived hydrogels. *Soft Matter* 2011;7:1090–9.

- [142] Lindblad MS, Ranucci E, Albertsson A-C. Biodegradable polymers from renewable sources. New hemicellulose-based hydrogels. *Macromolecular Rapid Communications* 2001;22:962–7.
- [143] Lindblad MS, Albertsson A-C, Ranucci E, Laus M, Giani E. Biodegradable Polymers from Renewable Sources: Rheological Characterization of Hemicellulose-Based Hydrogels. *Biomacromolecules* 2005;6:684–90.
- [144] Ranucci E, Spagnoli G, Ferruti P. 2-[(1-Imidazolyl)formyloxy]ethyl methacrylate as a new chemical precursor of functional polymers. *Macromolecular Rapid Communications* 1999;20:1–6.
- [145] Ranucci E, Grigolini M, Ferruti P. 2-[(1-Imidazolyl)formyloxy]ethyl Methacrylate as Selective Methacryloylating Agent: Kinetics of Reaction with Model Alcohols and Amines. *Macromolecular Bioscience* 2003;3:742–8.
- [146] Zhang X-Q, Chen M-J, Liu C-F, Sun R-C. Dual-Component System Dimethyl Sulfoxide/LiCl as a Solvent and Catalyst for Homogeneous Ring-Opening Grafted Polymerization of ϵ -Caprolactone onto Xylan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2014;62:682–90.
- [147] Enomoto-Rogers Y, Iwata T. Syntheses of poly(l-lactide)-block-xylan butyrate-block-poly(l-lactide) triblock copolymers and their properties. *Journal of Wood Science* 2013;1–10.
- [148] Enomoto-Rogers Y, Iwata T. Synthesis of xylan-graft-poly(l-lactide) copolymers via click chemistry and their thermal properties. *Carbohydrate Polymers* 2012;87:1933–40.
- [149] Rozie H, Somers W, Bonte A, Rombouts FM, Visser J. Crosslinked xylan as an affinity adsorbent for endo-xylanases. *Carbohydrate Polymers* 1992;17:19–28.
- [150] Salam A, Pawlak JJ, Venditti RA, El-tahlawy K. Incorporation of carboxyl groups into xylan for improved absorbency. *Cellulose* 2011;18:1033–41.
- [151] Bigand V, Pinel C, Perez DDS, Rataboul F, Petit-Conil M, Huber P. Influence of liquid or solid phase preparation of cationic hemicelluloses on physical properties of paper. *BioResources* 2013;8:2118–34.
- [152] Ebringerová A, Belicova A, Ebringer L. Antimicrobial activity of quaternized heteroxylans. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 1994;10:640–4.
- [153] Doctor VM, Lewis D, Coleman M, Kemp MT, Marbley E, Sauls V. Anticoagulant properties of semisynthetic polysaccharide sulfates. *Thrombosis Research* 1991;64:413–25.
- [154] Kiesel J, Harbauer G, Wenzel E, Pindur G, St. B. Comparison of the effects of sodium pentosanpolysulfate and unfractionated heparin on venous thrombosis; an experimental study in rats. *Thrombosis Research* 1991;64:301–8.

- [155] Hoffmann P, Bernat A, Dumas A, Petitou M, Hérault JP, Herbert JM. The synthetic pentasaccharide SR 90107A/Org 31540 does not release lipase activity into the plasma. *Thrombosis Research* 1997;86:325–32.
- [156] Hwang P, Auclair B, Beechinor D, Diment M, Einarson TR. Efficacy of pentosan polysulfate in the treatment of interstitial cystitis: A meta-analysis. *Urology* 1997;50:39–43.
- [157] Von Briesen H, Meichsner C, Andreesen R, Esser R, Schrinner E, Rübsamen-Waigmann H. The polysulphated polyxylan Hoe/Bay-946 inhibits HIV replication on human monocytes/macrophages. *Research in Virology* 1990;141:251–7.
- [158] Holmes HC, Mahmood N, Karpas A, Petrik J, Kinchington D, O'Connor T, et al. Screening of compounds for activity against HIV: A collaborative study. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 1991;2:287–93.
- [159] Schols D, Pauwels R, Witvrouw M, Desmyter J, De Clercq E. Differential activity of polyanionic compounds and castanospermine against HIV replication and HIV-induced syncytium formation depending on virus strain and cell type. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 1992;3:23–9.
- [160] Thormar H, Balzarini J, Debyser Z, Witvrouw M, Desmyter J, De Clercq E. Inhibition of visna virus replication and cytopathic effect in sheep choroid plexus cell cultures by selected anti-HIV agents. *Antiviral Research* 1995;27:49–57.
- [161] Hawkins MJ. Clinical trials of antiangiogenic agents. *Current Opinion in Oncology* 1995;7:90–3.
- [162] Fujisawa M, Arima S, Yachiku S. A study of inhibitory effect of chondroitin polysulfate on stone formation of calcium oxalate. *Japanese Journal of Urology* 1992;83:1647–54.
- [163] Senthil D, Subha K, Saravanan N, Varalakshmi P. Influence of sodium pentosan polysulphate and certain inhibitors on calcium oxalate crystal growth. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1996;156:31–5.
- [164] Rogachefsky RA, Dean DD, Howell DS, Altman RD. Treatment of canine osteoarthritis with sodium pentosan polysulfate and insulin-like growth factor-1. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1994;732:392–4.
- [165] Read RA, Cullis-Hill D, Jones MP. Systemic use of pentosan polysulphate in the treatment of osteoarthritis. *Journal of Small Animal Practice* 1996;37:108–14.
- [166] Bayol A, Lansen J, Maffrand J, Pereillo J, Vallée E. Nouveaux sulfates de xylanes, leur procédé de préparation et leur activité anti-thrombotique et hypolipémiante. FR2543145, 1983.

- [167] Christakopoulos P, Katapodis P, Kalogeris E, Kekos D, Macris BJ, Stamatis H, et al. Antimicrobial activity of acidic xylo-oligosaccharides produced by family 10 and 11 endoxylanases. *International Journal of Biological Macromolecules* 2003;31:171–5.
- [168] Fooks LJ, Fuller R, Gibson GR. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *International Dairy Journal* 1999;9:53–61.
- [169] Oku T, Nakamura S. Digestion, absorption, fermentation, and metabolism of functional sugar substitutes and their available energy. *Pure and Applied Chemistry* 2002;74:1253–61.
- [170] Crittenden RG, Playne MJ. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science and Technology* 1996;7:353–61.
- [171] Taniguchi H. Carbohydrate Research and Industry in Japan and the Japanese Society of Applied Glycoscience. *Starch - Stärke* 2004;56:1–5.
- [172] Gabriellii I, Gatenholm P. Preparation and properties of hydrogels based on hemicellulose. *Journal of Applied Polymer Science* 1998;69:1661–7.
- [173] Gabriellii I, Gatenholm P, Glasser WG, Jain RK, Kenne L. Separation, characterization and hydrogel-formation of hemicellulose from aspen wood. *Carbohydrate Polymers* 2000;43:367–74.
- [174] Hesse S, Liebert T, Heinze T. Studies on the film formation of polysaccharide based furan-2-carboxylic acid esters. *Macromolecular Symposia* 2006;232:57–67.

Chapitre I

Caractérisation de xylanes de bois feuillus



Les xylanes sont un type particulier d'hémicelluloses présents dans tous les bois et majoritairement dans les bois feuillus. Selon l'essence de l'arbre, son environnement ou encore les conditions d'extraction utilisées pour l'obtention de ces xylanes, leurs compositions et structures peuvent varier. Il convient donc de les caractériser avant d'envisager des modifications chimiques. La première partie de ce chapitre est consacrée à la caractérisation détaillée d'un lot de xylanes de hêtre. La seconde partie traite de la comparaison de différents lots de xylanes de hêtre mais aussi de xylanes de bouleau afin d'illustrer cette variabilité.

Sommaire

Partie A.	87
Caractérisation détaillée d'un des lots	87
I. Composition en oses neutres des xylanes	87
I.1. Analyse par HPLC	88
I.2. Analyse par GC	89
II. Analyse structurale	90
III. Détermination de la masse molaire des xylanes	93
III.1. Analyses par SEC	93
III.2. Analyse MALDI-TOF	95
IV. Comportement thermique	96
Partie B.	98
Comparaison de 8 lots de xylanes	98
I. Les différents lots et les analyses effectuées	98
II. Résultats	99
Conclusion	101
Références	102

Partie A.

Caractérisation détaillée d'un des lots

De manière générale, la caractérisation des hémicelluloses s'articule autour de trois axes:

- La composition en oses neutres : elle se détermine généralement par chromatographie en phase liquide (**HPLC**) ou gazeuse (**GC**). Pour cela, il faut dans un premier temps hydrolyser le xylane jusqu'au monomère par hydrolyse acide, par hydrolyse enzymatique, ou par méthanolyse [1]. Pour l'analyse en GC, il faut ensuite rendre les monomères volatils par acétylation, méthylation ou silylation [2–6].
- L'analyse structurale [7]: elle est généralement réalisée par spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (**RMN**) [8–13]. Cette technique permet d'identifier la nature de la chaîne, la configuration anomérique des protons mais aussi de déterminer le taux moyen d'unités acide glucuronique et de groupements acétyle.
- La détermination de la masse molaire : elle est réalisée le plus souvent par chromatographie d'exclusion stérique (**SEC**) [14–19]. Cette technique permet de séparer différentes populations de xylanes en fonction de leur masse ou plus précisément de leur volume hydrodynamique. La détection peut se faire par un réfractomètre différentiel, un spectrophotomètre UV, un viscosimètre ou encore un détecteur à diffusion de lumière laser multi-angles (**MALLS**).

Dans cette partie, la caractérisation détaillée d'un lot de xylanes de hêtre (lot 2) est effectuée suivant les trois axes décrits ci-dessus.

I. Composition en oses neutres des xylanes

La composition en oses neutres des xylanes du lot 2 a été étudiée par HPLC et par GC. Les xylanes sont d'abord hydrolysés de manière à obtenir des monomères non dégradés. L'hydrolyse totale par l'acide sulfurique d'après la norme TAPPI T249cm-85 a été définie comme appropriée dans le cas des xylanes et utilisée pour cette étude [20]. Les sucres obtenus sont ensuite acétylés pour permettre leur analyse par GC [2].

I.1. Analyse par HPLC

Après hydrolyse totale, les monomères obtenus sont directement analysés par HPLC, sans acétylation. Les sucres de référence sont aussi analysés par HPLC, dans les mêmes conditions, pour connaître leur temps de rétention (Figure 1). Tous les échantillons sont préparés précisément à la concentration de 1 g/L ce qui permet d'estimer quantitativement le pourcentage massique de chaque monomère de l'échantillon.

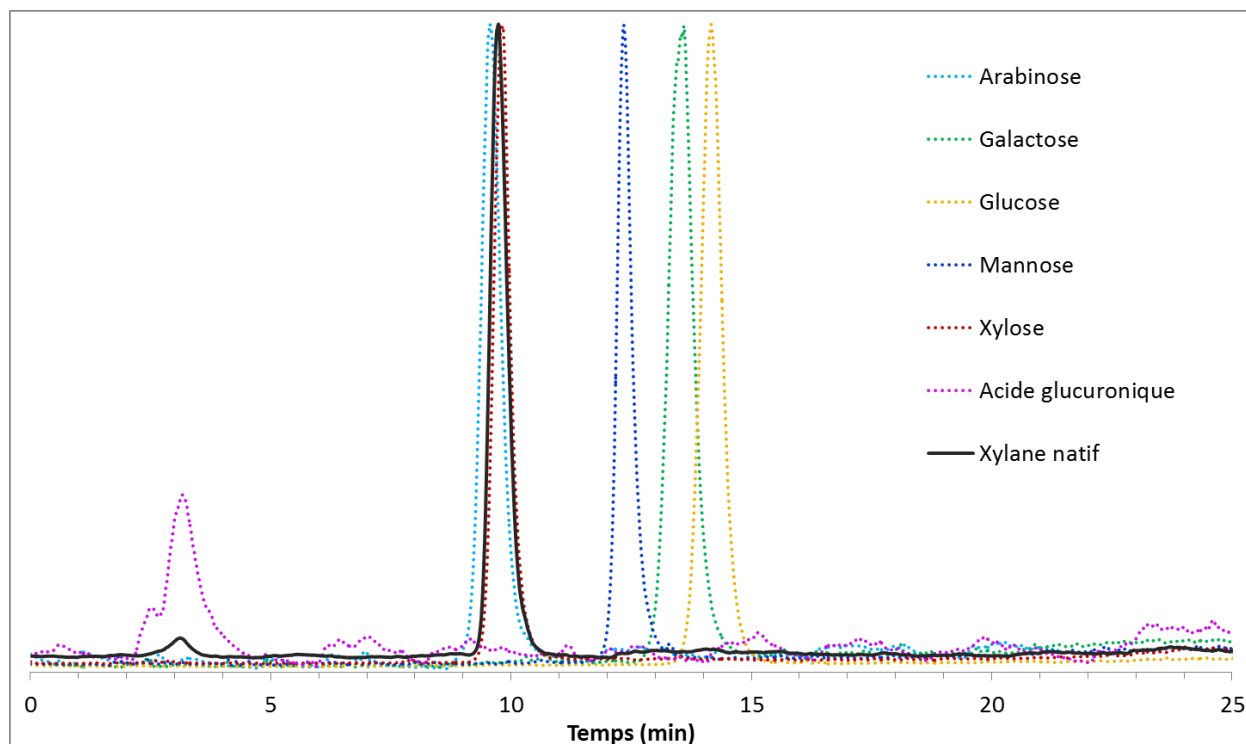


Figure 1. Chromatogrammes HPLC à détection ELSD des xylanes de hêtre (en noir) et des sucres de référence (Ara en bleu clair, Gal en vert, Glu en jaune, Man en bleu foncé, Xyl en rouge et MeGlcA en rose)

L'analyse HPLC confirme très clairement que les xylane étudiés sont constitués en très grande majorité de xyloses. La détection du signal correspondant à l'acide glucuronique a également été possible. Grâce à des concentrations précises, il a été déterminé que l'échantillon est composé de 74,6% de xylose et de 12,0% d'acide glucuronique. Le reste de la masse de l'échantillon peut correspondre à des traces d'autres sucres, à de l'eau liée ou encore à de la lignine résiduelle.

I.2. Analyse par GC

Après acétylation, les monomères sont analysés par GC. De la même manière qu'en HPLC, des sucres de référence ont été acétylés par la même technique et analysés en GC dans les mêmes conditions (Figure 2). Pour permettre une analyse quantitative, un étalon interne, le myo-inositol, est ajouté à l'échantillon étudié. L'analyse GC confirme là encore que les xylanes étudiés sont constitués en très grande majorité de xyloses et indique la présence de traces d'autres sucres.

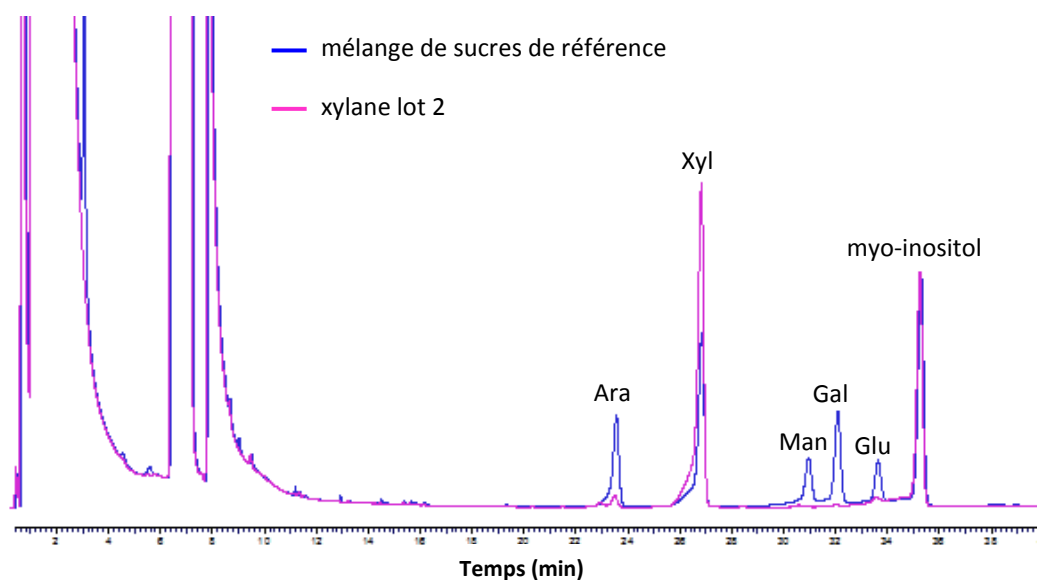


Figure 2. Chromatogrammes GC à détection FID des xylanes de hêtre (en rose) et du mélange de sucres de référence (en bleu), tout deux contenant du myo-inositol comme étalon interne

En chromatographie, les aires des pics sont proportionnelles à la quantité de produit injectée. Le coefficient de proportionnalité, K_i , peut alors être déterminé pour chaque sucre de référence par rapport à l'étalon interne (ici le myo-inositol) par $K_i = \frac{m_i}{A_i} \times \frac{A_{\text{étalon}}}{m_{\text{étalon}}}$, avec m la masse injectée et A l'aire du pic [21].

Afin d'obtenir des K_i représentatifs, les sucres de référence avec le myo-inositol ont été injectés en triplicats à trois volumes d'injection différents, *i.e.* 1, 3 et 5 μL . Les résultats obtenus sont compilés dans le Tableau 1.

Tableau 1. Résultats obtenus par GC à détection FID des xylanes de hêtre

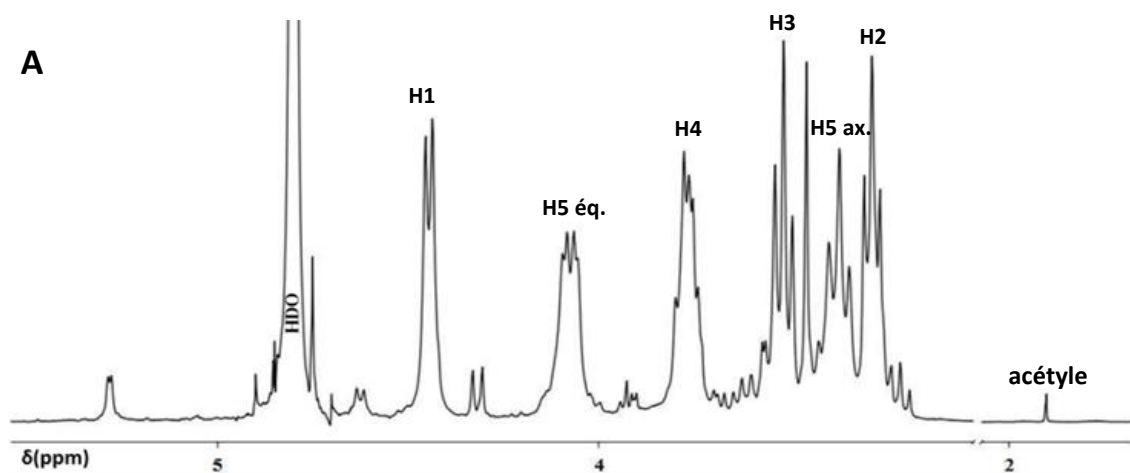
i	Ki moyen	Ecart type	Déviati Standard %	% massique
Xylose	1,0366	0,0390	3,76	70,60 ± 0,08
Glucose	0,9372	0,0050	0,53	1,00 ± 0,03
Galactose	0,9297	0,0093	1,00	0,26 ± 0,01
Arabinose	0,9346	0,0186	1,99	1,62 ± 0,01
Mannose	1,1292	0,0097	0,86	0,47 ± 0,03

Les Ki moyens permettent de déterminer que l'échantillon est composé à 70,6% de xylose et que le second sucre le plus représenté est l'arabinose avec seulement 1,6%. Le pourcentage de xylose obtenu par GC est un peu inférieur à celui obtenu par HPLC mais tout à fait cohérent. La masse restante correspond donc à l'acide glucuronique qui n'est pas dosé par cette technique, aux traces des autres sucres, et sûrement à de l'eau liée ainsi qu'à de la lignine résiduelle.

II. Analyse structurale

La spectroscopie RMN donne accès à des informations sur la nature et la configuration des monosaccharides permettant ainsi de remonter à la structure des hémicelluloses. Les xylanes natifs ont été étudiés par spectroscopies RMN à 1 et 2 dimensions (^1H , ^{13}C et HSQC).

Tout d'abord, les spectres proton et carbone (Figure 3) montrent que les déplacements chimiques obtenus sont en adéquation avec ceux rapportés dans la littérature [22,23].



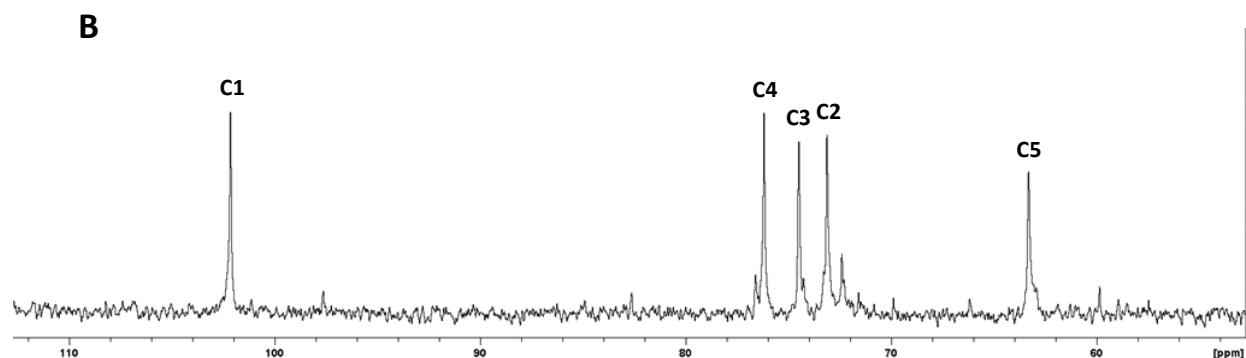


Figure 3. Spectres RMN proton (A) et carbone (B) du xylane dans D₂O ; la numérotation est présentée Figure 5

Les spectres montrent 5 pics principaux dont les déplacements chimiques correspondent à des unités xylose, non ramifiées, reliées entre elles par liaison β -1,4 (Tableau 2). Le doublet attribué aux protons en position 1 est associé à une constante de couplage de 7 Hz, valeur caractéristique d'une liaison osidique de type β . D'autres signaux moins intenses sont caractéristiques de l'acide 4-*O*-méthyle-D-glucuronique (**MeGlcA**) et des unités xylose ramifiées par un MeGlcA. L'attribution des signaux a été réalisée grâce à l'interprétation du spectre de l'analyse en spectroscopie RMN en deux dimensions, proton-carbone (HSQC), représenté Figure 4. Dans le cas des unités xylose ramifiées par un MeGlcA, le doublet attribué aux protons en position 1 est associé à une constante de couplage de 2 Hz, valeur caractéristique d'une liaison osidique de type α [24]. Le pic à 1,9 ppm en RMN du proton correspond aux groupements acétyle pouvant être présents en position 2 ou 3 des unités xylose.

Tableau 2. Récapitulatif des déplacements chimiques ^1H et ^{13}C des principaux signaux correspondant aux unités xylose non ramifiées

	Position	^1H δ (ppm)	^{13}C δ (ppm)
Unité xylose non ramifié MeGlcA	1	4,31	102,3
	2	3,17	73,2
	3	3,36	74,8
	4	3,64	75,9
	5 _{équatorial} /5 _{axial}	3,96/3,25	63,3

En s'assurant d'un délai et d'un nombre de scans suffisants – 128 scans, 20 secondes – l'analyse RMN est quantitative. L'intégration des signaux caractéristiques des xyloses d'une part et des MeGlcA d'autre part permet donc de déterminer la proportion relative d'unités xylose pour un

MeGlcA ici égale à 12 :1. Cette valeur est typiquement celle retrouvée dans la littérature pour des xylanes de hêtre [25]. Le même calcul a été fait pour les groupements acétyle qui sont représentés à hauteur de 1 pour 91 unités xylose, soit une quantité très faible de groupements acétyle. Ces xylanes de hêtre ont donc vraisemblablement été extraits en milieu alcalin et seront qualifiés de 4-*O*-méthylglucunoxylanes (**MGX** ; Figure 5).

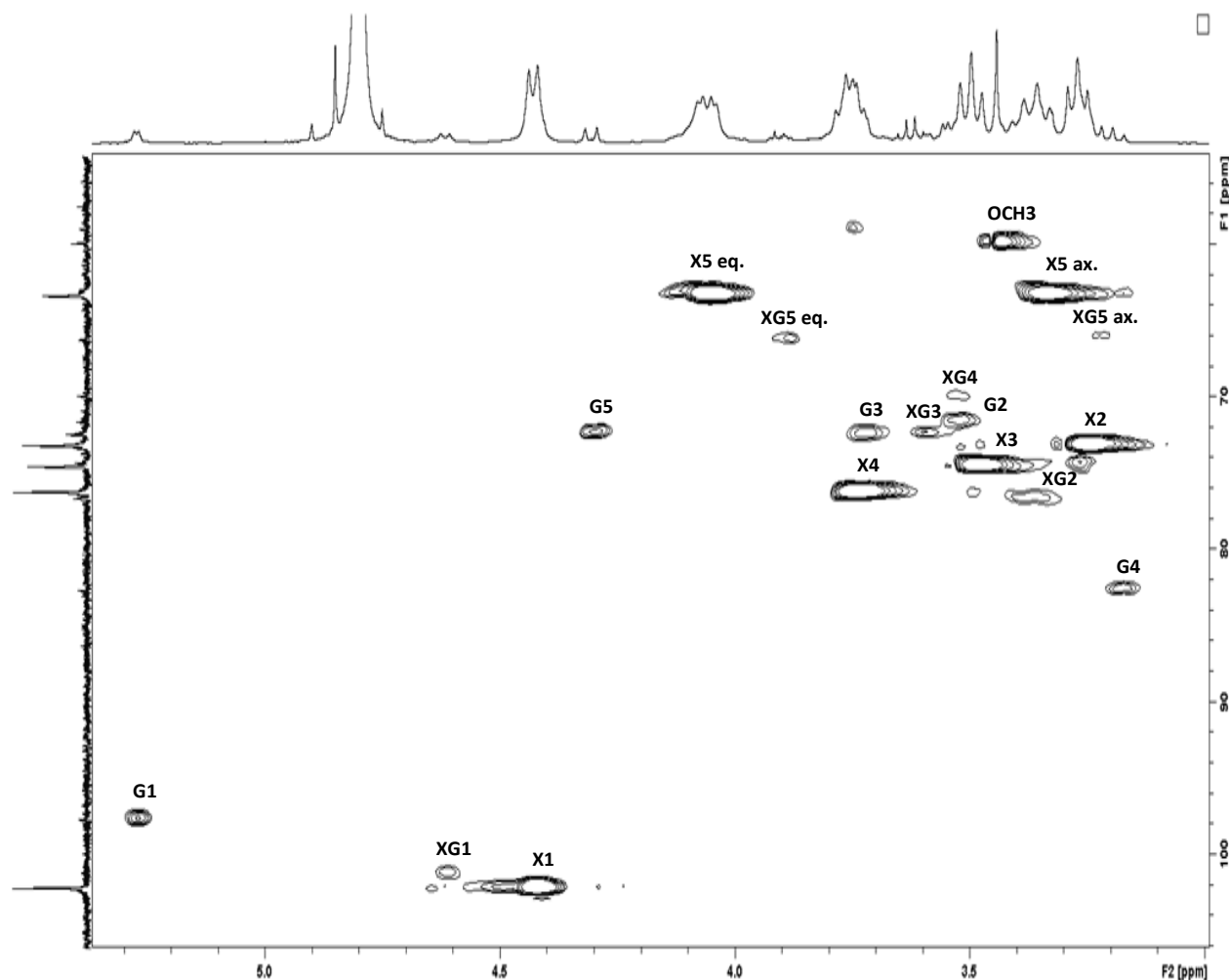


Figure 4. Spectre HSQC du xylane (D_2O). Avec, G – unité MeGlcA, X – unité xylose non ramifiée, et XG – unité xylose ramifiée MeGlcA. Les chiffres se réfèrent aux atomes H et C d'après la numérotation présentée Figure 5

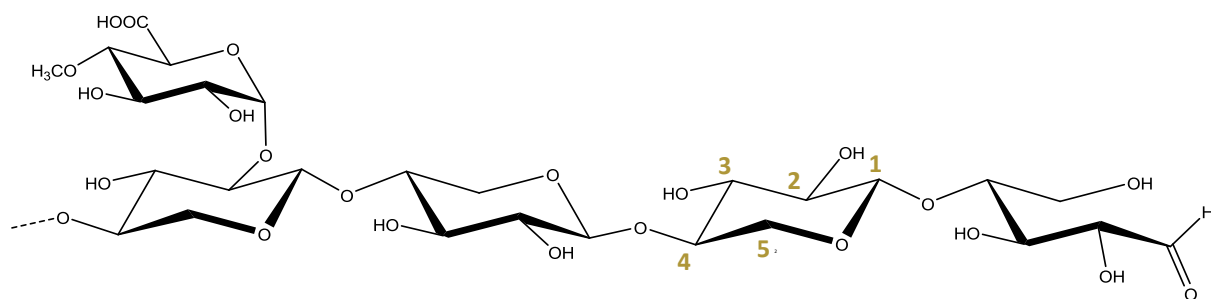


Figure 5. Structure d'un 4-*O*-méthylglucunoxylane

III. Détermination de la masse molaire des xylanes

La distribution en masse de ces MGX a été étudiée par SEC en fonction des appareillages disponibles au laboratoire : deux types de SEC en milieu aqueux ont alors été réalisés. Le premier appareillage est équipé de détecteurs RI et UV. Le second de détecteurs RI et MALLS. Une autre technique complémentaire a été utilisée, *i.e.* la spectroscopie de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice et un analyseur à temps de vol (**MALDI-TOF**).

III.1. Analyses par SEC

Dans un premier temps, l'analyse SEC avec détecteurs UV et RI a été réalisée. Seul le signal RI a été pris en considération, les xylanes n'émettant pas dans l'UV. La détection RI révèle la présence de deux populations dans l'échantillon natif (Figure 6, courbe grise). La population dont le temps d'élution est à environ 24 minutes est attribuée à des MGX agrégés en solution aqueuse. En effet, les xylanes pas ou peu ramifiés ont été rapportés comme formant des agrégats très difficiles à solubiliser dans l'eau [14,26]. La population correspondant aux MGX solubilisés se situe entre 26 et 38 minutes d'élution.

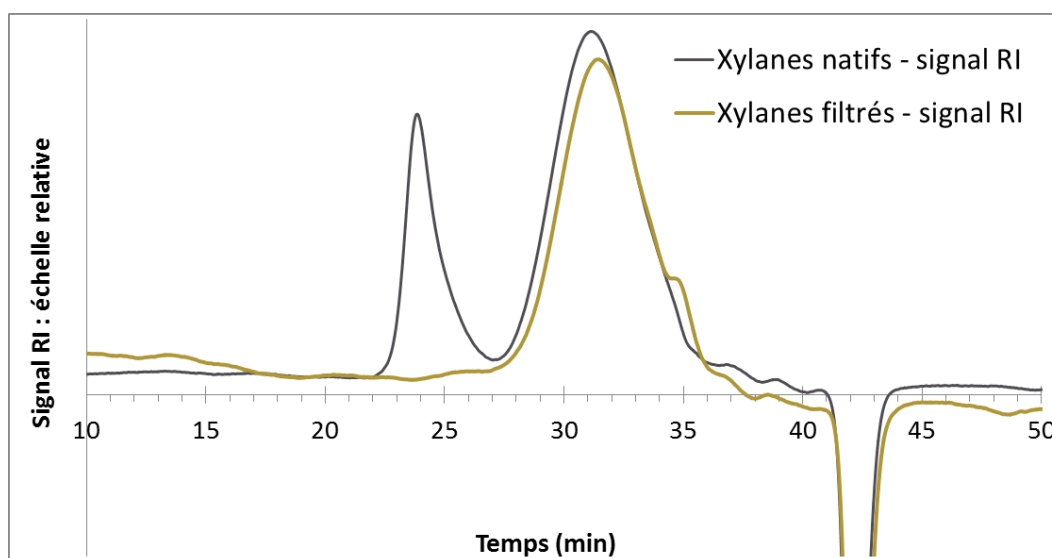


Figure 6. Chromatogrammes SEC-RI du MGX natif (courbe grise) et ultrafiltré (courbe jaune or)

L'utilisation d'un détecteur RI implique un calibrage par des polymères étalon de masses molaires définies. Ces étalons doivent avoir la structure la plus proche possible de celle des xylanes afin d'obtenir des masses molaires relatives proches de la réalité. Un calibrage avec des

pullulanes a permis de calculer une masse molaire de 15500 g/mol ($\bar{D} = 1,43$). Notons qu'un calibrage pullulane donne généralement des masses relatives plus élevées que celles obtenues par viscosimétrie [14], à cause des ramifications MeGlcA présentes sur les xylanes [27].

Afin d'obtenir la masse molaire 'vraie', il est possible d'utiliser un détecteur MALLS. Néanmoins, la présence d'agrégats rend la mesure impossible car leur diffusion est trop intense. Il a donc été nécessaire de procéder à une ultrafiltration sur membrane 300 kDa pour enlever les agrégats (Figure 6, courbe trait plein). Le filtrat représente 64 % de la masse totale des MGX et sa stabilité a été confirmée sur 28 jours. Rétentat et filtrat ont été analysés par SEC à détection RI ainsi que par RMN et les résultats sont donnés dans le Tableau 3. La membrane de 300 kDa a permis de séparer les agrégats du reste de l'échantillon mais elle a aussi éliminé les MGX solubilisés de fortes masses molaires. C'est ce qui explique que la masse molaire du filtrat soit légèrement inférieure à celle du natif. L'analyse RMN confirme que la population du rétentat contient moins de d'unités MeGlcA - environ deux fois moins - ce qui est en totale adéquation avec l'influence des substituants sur le comportement des xylanes en solution.

Tableau 3. Récapitulatif des résultats obtenus par RMN du proton et SEC-RI pour le MGX natif, le filtrat et le rétentat

Substrat	Intégration RMN ^1H		SEC-RI (calibrage pullulane)		
	Nombre d'unités xylose par MeGlcA	Nombre d'unités xylose par groupement acétyle	\bar{M}_w (g/mol)	\bar{M}_n (g/mol)	\bar{D}
MGX natif	12	91	15500	10900	1,43
Filtrat	8	56	13900	8900	1,57
Rétentat	17	500	21100	16500	1,27

Une analyse par SEC-MALLS a donc pu être réalisée sur le MGX filtré (Figure 7). La double détection (RI-courbe trait plein et MALLS-courbe pointillée) montre qu'il reste en solution un nombre très limité d'agrégats. En effet, ils sont si peu nombreux qu'ils ne sont pas visibles par détection RI mais leur importante taille permet leur détection MALLS.

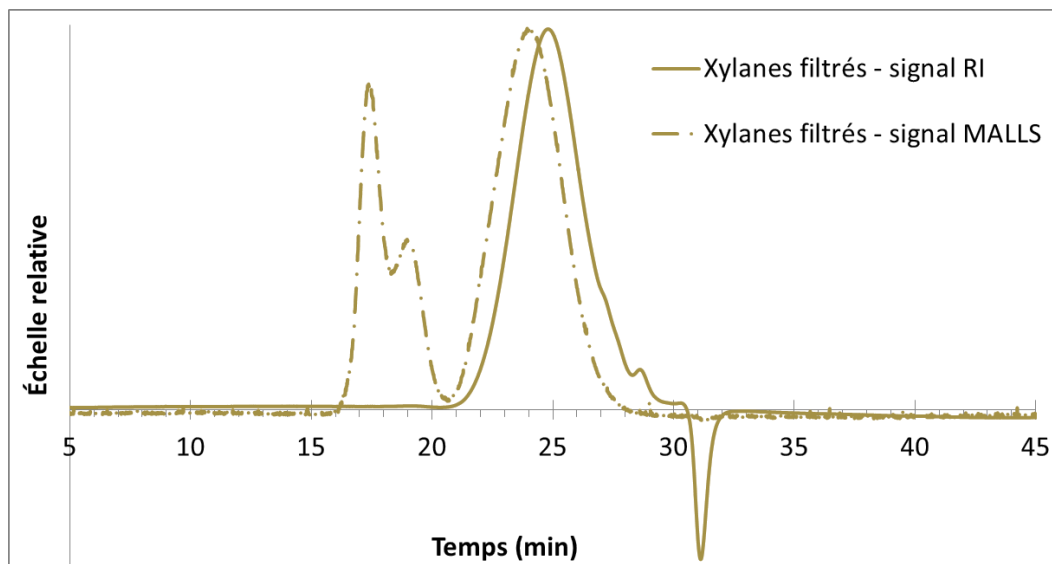


Figure 7. Chromatogramme SEC à détection RI (courbe en trait plein) et MALLS (courbe pointillée) du MGX filtré

Pour calculer la masse molaire absolue grâce à l'analyse MALLS, l'incrément d'indice de réfraction (dn/dc) du xylane filtré a été mesuré et trouvé égal à 0,1505 mL/g. Cette valeur a permis le calcul d'une masse molaire égale à 4700 g/mol ($\Phi = 1,55$). Comme attendu, cette valeur est bien inférieure à celle obtenue par SEC avec détection RI et calibrage pullulane, *i.e.* 13900 g/mol pour le filtrat. Le lot 2 de xylanes de hêtre, après filtration, a donc un degré de polymérisation d'environ 35 et en moyenne 1 MeGlcA pour 8 unités xylose.

III.2. Analyse MALDI-TOF

La caractérisation par spectroscopie de masse MALDI-TOF a connu un véritable essor au cours de ces dernières années. Cette technique a par exemple été utilisée pour la détermination des masses molaires de xylanes et de glucomannanes [10,15,28]. Cette technique présente certains avantages tels qu'un niveau élevé de la sensibilité de détection ou l'obtention d'une masse vraie. Néanmoins elle présente l'inconvénient majeur, de par son principe, de favoriser la détection des chaînes de faibles masses molaires puisque celles-ci seront plus aisément désorbées de la matrice que leurs homologues de masses molaires plus élevées. L'analyse MALDI-TOF du MGX a été réalisée sur un échantillon filtré. Le spectrogramme obtenu (Figure 8) montre une large dispersité de l'échantillon ainsi qu'une masse molaire inférieure à 6000 g/mol mais ne permet pas de détermination plus précise.

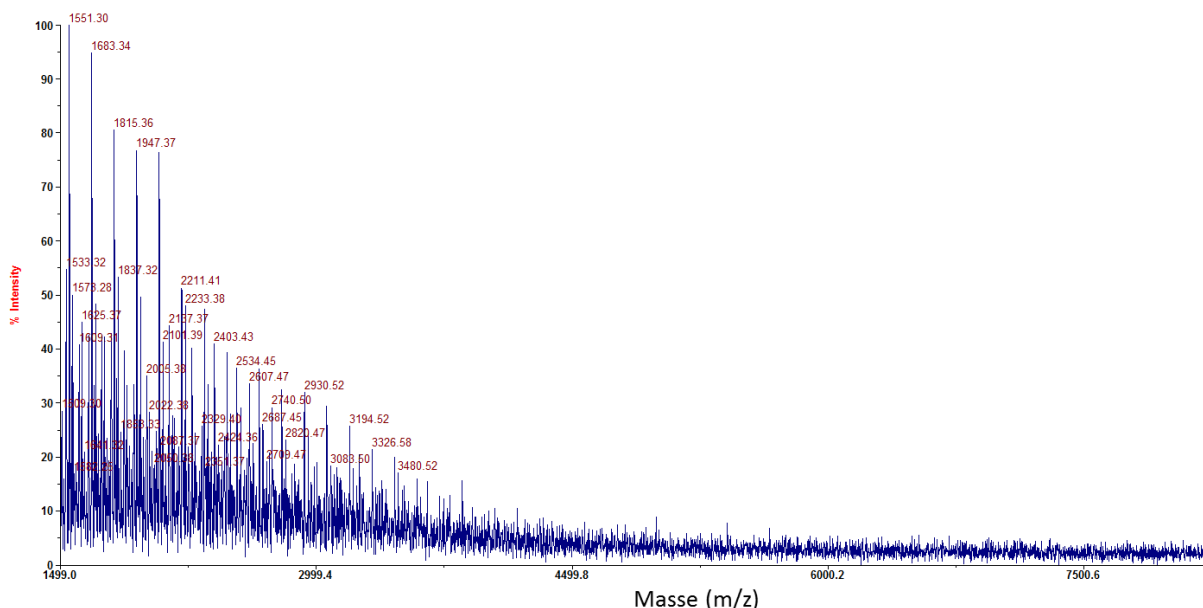


Figure 8. Spectre MALDI-TOF du MGX après filtration (matrice 2,5-DHB)

IV. Comportement thermique

Afin de caractériser le comportement thermique des MGX, des analyses TGA et DSC ont été réalisées. D'après l'analyse TGA (Figure 9—a et b pour la dérivée de la masse par rapport à la température), la perte de masse entre 30 et 180°C correspond à l'évaporation de l'eau, libre et liée (4%).

Une perte de masse conséquente est observée entre 180 et 350°C correspondant à la dégradation de la grande majorité des hémicelluloses (67,5%). Pendant cette dégradation principale, deux maxima de la dérivée (Figure 9—b) sont observés à 228 et 283°C, correspondant à ce qui est généralement observé dans la littérature [29–31]. Ces deux stades de dégradation correspondent *a priori* à la scission du squelette et à la décomposition des MeGlcA, suivies par la fragmentation des unités xylose dépolymérisées.

Le reste est lentement dégradé jusque 800°C (7%). Sous azote à 800°C, il y a environ 21,5% de résidu. En passant sous oxygène, la combustion diminue ce taux à 5,2%. Ce taux de cendre correspond à ceux généralement observés dans la littérature (entre 3 et 10%) et correspond en général à de la silice, à des métaux tels que le sodium, le potassium, le calcium et le magnésium [32].

Aucun signal n'est observé par analyse DSC. En effet, la température de transition vitreuse des glucides comme celle des xylanes est généralement supérieure à leur température de dégradation [33].

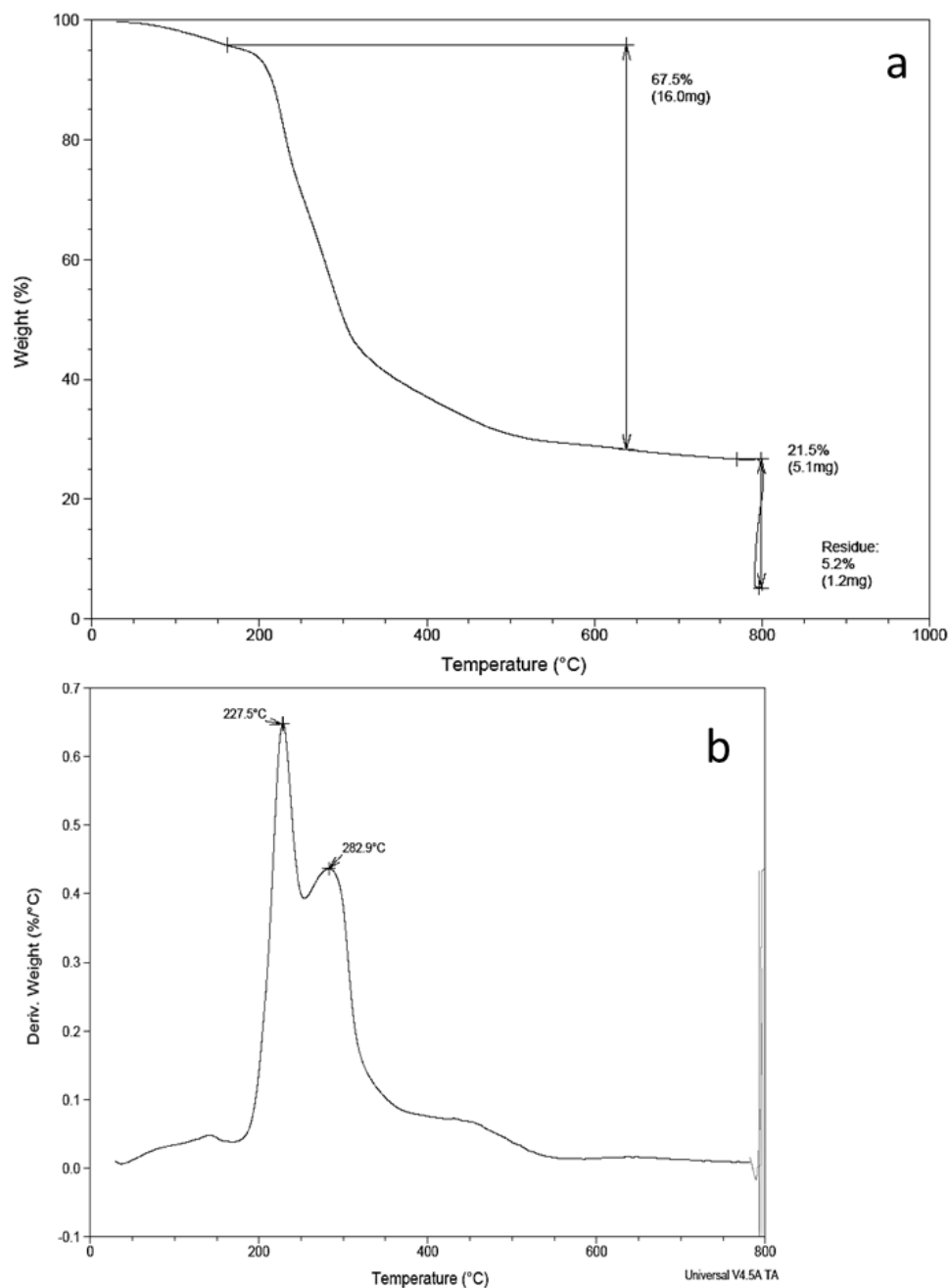


Figure 9. Analyse TGA du MGX avec la masse (a) et sa dérivée par rapport à la température (b) en fonction de la température (réalisée de 30 à 800°C sous azote à 10°C/min puis mise sous oxygène)

Partie B.

Comparaison de 8 lots de xylanes

La partie A a permis de détailler les analyses faites pour la caractérisation complète d'un des lots de xylanes de hêtre acheté chez Sigma Aldrich. Dans la partie B, deux analyses clés – RMN et SEC – vont permettre de comparer entre eux différents lots de xylanes qui seront utilisés par la suite.

I. Les différents lots et les analyses effectuées

Au regard de la variabilité potentielle des xylanes en fonction de leur essence mais aussi de leurs conditions d'extraction, différents lots sont comparés entre eux : quatre lots de xylanes de hêtre achetés chez Sigma Aldrich à différentes dates, deux lots de xylanes de hêtre achetés chez Symrise, et deux lots xylanes de bouleau, un acheté chez Sigma Aldrich et l'autre fourni par FCBA. Le Tableau 4 récapitule le détail des différents lots. La couleur de la poudre renseigne qualitativement sur la pureté des échantillons. Purs, les xylanes ont un aspect blanc à beige. Une couleur plus foncée est *a priori* due à la présence de lignine résiduelle dans l'échantillon.

Tableau 4. Caractéristiques des différents lots de xylanes à comparer

Lot n°	Essence	Fournisseur	Conditionnement	Aspect de la poudre	Date d'acquisition
1	Hêtre	Sigma Aldrich	100 g	Beige	02/2011
2			250 g	Blanc cassé	11/2011
3				Brun	11/2012
4				Brun	
5		Symrise	100 g	Brun	09/2013
6			2 kg	Brun	12/2013
7	Bouleau	Sigma Aldrich	100 g	Brun	02/2011
8		FCBA	500 g	Brun foncé	03/2012

II. Résultats

L'analyse RMN du proton dans D₂O permet de confirmer la structure de 4-O-méthylglucuronoxylane attendue, mais aussi de calculer la proportion relative de MeGlcA par rapport aux unités xylose. L'analyse en SEC avec détecteur RI (calibrage pullulane) permet d'obtenir les masses molaires relatives. Certains des lots, utilisés par la suite, ont aussi été analysés en SEC à détection MALLS, après ultrafiltration, pour obtenir les masses molaires vraies et ainsi estimer leur degré de polymérisation. Le Tableau 5 résume les résultats RMN, SEC-RI et SEC-MALLS obtenus pour les différents lots de xylanes étudiés.

Tableau 5. Récapitulatifs des différents résultats obtenus par RMN et SEC pour les différents lots de xylanes étudiés

Lot n°	unités xylose : 1 MeGlcA	\bar{M}_w -RI (g/mol)	\bar{M}_w -MALLS (g/mol)	\overline{DP}_n
1	5	31 300	x	x
2	12	17 000	4700	35
3	11	28 800	x	x
4	10	28 800	18 000	120
5	8	25 200	x	x
6	8	27 000	8100	50
7	11	43 400	x	x
8	6	31 600	x	x

Tout d'abord, les lots 1 à 3 (même fournisseur) sont comparés. Ces lots, achetés à différentes dates sur une période d'un an, diffèrent de par leur taille et structure. En effet, le lot 1 correspond plutôt à des xylanes de masse molaire élevée et très ramifiés, alors que le lot 2 correspond à des xylanes de masse molaire plus faible et moins ramifiés. Le lot 3 correspond à des xylanes de taille et de taux de MeGlcA intermédiaires. D'après la couleur des poudres de xylane, la pureté des échantillons peut aussi varier.

Les lots 3 et 4, quant à eux, ont été achetés à la même date et sont très similaires entre eux. Ils pourront donc *a priori* être utilisés de la même manière sans distinction particulière.

De la même manière, les lots 5 et 6 achetés à 3 mois d'intervalles chez Symrise sont très similaires entre eux. Ils seront donc utilisés sans distinction particulière. Malgré des masses molaires très proches entre les lots 3, 4, 5 et 6 par SEC-RI, il apparaît par SEC-MALLS que les masses molaires absolues des lots 4 et 6 sont en fait éloignées, ce qui est difficile à expliquer.

Enfin, les lots 7 et 8 sont les deux seuls lots de xylanes de bouleau. Ils sont différents entre eux et différents des xylanes de hêtre tout en restant dans les mêmes gammes de masse et de taux de ramification. Globalement, les xylanes de bouleau sont de masse molaire plus élevée par rapport aux xylanes de hêtre mais il est difficile de conclure. De plus, les xylanes de bouleau du FCBA sont plus riches en lignine que ceux achetés chez Sigma Aldrich comme en témoigne leur couleur brun foncé.

Conclusion

Ce premier chapitre a donc permis la caractérisation complète de xylanes de bois feuillus (lot 2). Les analyses RMN ^1H , ^{13}C et HSQC ont confirmé que les xylanes étudiés sont des 4-*O*-méthylglucuronoxylanes, *i.e.* des chaînes d'unités xylose reliées entre elles par liaison β -1,4 et pouvant être substituées par liaison α -1,2 à des MeGlcA. Les xylanes présentent une masse molaire absolue de 4700 g/mol (SEC-MALLS) soit un degré de polymérisation d'environ 35. L'analyse par RMN ^1H a permis d'estimer le nombre moyen d'unités xylose par MeGlcA égal à 8.

Les analyses RMN et SEC-RI ont aussi permis de comparer entre eux huit différents lots de xylanes. La plupart de ces lots possèdent des ratios xylose:MeGlcA relativement proches (de 8 à 12) et des masses molaires du même ordre de grandeur (20 000-30 000 g/mol ; calibration pullulane). Les modifications apportées aux xylanes dans la suite du travail de thèse seront donc *a priori* généralisables à la fois aux xylanes de hêtre et de bouleau.

Références

- [1] Willför S, Pranovich A, Tamminen T, Puls J, Laine C, Suurnäkki A, et al. Carbohydrate analysis of plant materials with uronic acid-containing polysaccharides-A comparison between different hydrolysis and subsequent chromatographic analytical techniques. *Industrial Crops and Products* 2009;29:571–80.
- [2] Blakeney AB, Harris PJ, Henry RJ, Stone BA. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydrate Research* 1983;113:291–9.
- [3] Laine C, Tamminen T, Vikkula A, Vuorinen T. Methylation Analysis as a Tool for Structural Analysis of Wood Polysaccharides. *Holzforschung* 2002;56:607–14.
- [4] Doares SH, Albersheim P, Darvill AG. An improved method for the preparation of standards for glycosyl-linkage analysis of complex carbohydrates. *Carbohydrate Research* 1991;210:311–7.
- [5] Li J, Kisara K, Danielsson S, Lindström ME, Gellerstedt G. An improved methodology for the quantification of uronic acid units in xylans and other polysaccharides. *Carbohydrate Research* 2007;342:1442–9.
- [6] Hakomori S. A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. *J Biochem Tokyo* 1964;55:205–8.
- [7] Cui SW. Structural Analysis of Polysaccharides. In: Cui SW, editor. *Food Carbohydrates Chemistry, Physical Properties, and Applications*. Taylor & F, CRC Press; 2005.
- [8] Teleman A, Lundqvist J, Tjerneld F, Ståhlbrand H, Dahlman O. Characterization of acetylated 4-O-methylglucuronoxylan isolated from aspen employing ¹H and ¹³C NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research* 2000;329:807–15.
- [9] Hannuksela T, Hervé du Penhoat C. NMR structural determination of dissolved O-acetylated galactoglucomannan isolated from spruce thermomechanical pulp. *Carbohydrate Research* 2004;339:301–12.
- [10] Lundqvist J, Teleman A, Junel L, Zacchi G, Dahlman O, Tjerneld F, et al. Isolation and characterization of galactoglucomannan from spruce (*Picea abies*). *Carbohydrate Polymers* 2002;48:29–39.
- [11] Peng F, Bian J, Ren J-L, Peng P, Xu F, Sun R-C. Fractionation and characterization of alkali-extracted hemicelluloses from peashrub. *Biomass and Bioenergy* 2012;39:20–30.
- [12] Needs PW, Selvendran RR. An improved methylation procedure for the analysis of complex polysaccharides including resistant starch and a critique of the factors which lead to undermethylation. *Phytochemical Analysis* 1993;4:210–6.

- [13] Purdie T, Irvine JC. CVII. - Synthesis from glucose of an octamethylated disaccharide. Methylation of sucrose and maltose. *Journal of the Chemical Society, Transactions* 1905;87:1022–30.
- [14] Saake B, Kruse T, Puls J. Investigation on molar mass, solubility and enzymatic fragmentation of xylans by multi-detected SEC chromatography. *Bioresource Technology* 2001;80:195–204.
- [15] Jacobs A, Lundqvist J, Stålbrand H, Tjerneld F, Dahlman O. Characterization of water-soluble hemicelluloses from spruce and aspen employing SEC/MALDI mass spectroscopy. *Carbohydrate Research* 2002;337:711–7.
- [16] Sarbu A, Gonçalves F, de Pinho MN. Oat spelts xylan molecular mass estimation by size exclusion chromatography. *Carbohydrate Polymers* 2003;53:297–304.
- [17] Jacobs A, Dahlman O. Characterization of the Molar Masses of Hemicelluloses from Wood and Pulps Employing Size Exclusion Chromatography and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Biomacromolecules* 2001;2:894–905.
- [18] Stoklosa RJ, Hodge DB. Extraction, recovery, and characterization of hardwood and grass hemicelluloses for integration into biorefining processes. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 2012;51:11045–53.
- [19] Evtuguin D, Tomás J, Silva AS, Neto C. Characterization of an acetylated heteroxylan from *Eucalyptus globulus* Labill. *Carbohydrate Research* 2003;338:597–604.
- [20] Tappi method T249 cm-85. Carbohydrate composition of extractive-free wood and wood pulp by gas-liquid chromatography. Tappi Press 1997.
- [21] Vergnol A. L'analyse quantitative. In: Tranchant J, editor. *Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse*. 4e édition, Masson; 1995.
- [22] Teleman A, Tenkanen M, Jacobs A, Dahlman O. Characterization of O-acetyl-(4-O-methylglucurono)xylan isolated from birch and beech. *Carbohydrate Research* 2002;337:373–7.
- [23] Gustavsson M, Bengtsson M, Gatenholm P, Glasser W, Teleman A, Dahlman O. Isolation, Characterisation and Material Properties of 4-O-Methylglucuronoxylan from Aspen. *Biorelated Polymers: Sustainable Polymer Science and Technology* 2001:41–52.
- [24] Barbat A, Gloaguen V, Moine C, Sainte-catherine O, Kraemer M, Rogniaux H, et al. Structural Characterization and Cytotoxic Properties of a 4- O -Methylglucuronoxylan from *Castanea sativa*. 2 . Evidence of a Structure - Activity Relationship. *Journal of Natural Products* 2008;71:1404–9.

- [25] Jacobs A, Dahlman O. Enhancement of the quality of MALDI mass spectra of highly acidic oligosaccharides by using a nafion-coated probe. *Analytical Chemistry* 2001;73:405–10.
- [26] Ebringerová A, Hromadková Z, Burchard W, Dolega R, Vorwerg W. Solution properties of water-insoluble rye-bran arabinoxylan. *Carbohydrate Polymers* 1994;24:161–9.
- [27] Goring DAI, Timell TE. Molecular properties of six 4-O-methylglucuronoxylans. *The Journal of Physical Chemistry* 1960;64:1426–30.
- [28] Teleman A, Nordström M, Tenkanen M, Jacobs A, Dahlman O. Isolation and characterization of O-acetylated glucomannans from aspen and birch wood. *Carbohydrate Research* 2003;338:525–34.
- [29] Shen DK, Gu S, Bridgwater A V. Study on the pyrolytic behaviour of xylan-based hemicellulose using TG-FTIR and Py-GC-FTIR. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 2010;87:199–206.
- [30] Shafizadeh F, McGinnis GD, Philpot CW. Thermal degradation of xylan and related model compounds. *Carbohydrate Research* 1972;25:23–33.
- [31] Werner K, Pommer L, Broström M. Thermal decomposition of hemicelluloses. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 2014. doi:10.1016/j.jaap.2014.08.013.
- [32] Otieno DO, Ahring BK. The potential for oligosaccharide production from the hemicellulose fraction of biomasses through pretreatment processes: Xylooligosaccharides (XOS), arabinoooligosaccharides (AOS), and mannoooligosaccharides (MOS). *Carbohydrate Research* 2012;360:84–92.
- [33] Xiao B, Sun XF, Sun R. Chemical, structural, and thermal characterizations of alkali-soluble lignins and hemicelluloses, and cellulose from maize stems, rye straw, and rice straw. *Polymer Degradation and Stability* 2001;74:307–19.

Chapitre II

Synthèse et caractérisation d'oligomères de xylane bien définis



Produit de l'hydrolyse partielle des xylanes

Les xylo-oligosaccharides (**XOS**) présentent un fort intérêt pour leur utilisation comme additif alimentaire (Etude Bibliographique, Partie B, IV.3). De plus, les XOS à structure définie sont des substrats d'importance pour servir de modèles à la compréhension et à l'optimisation des procédés d'hydrolyse. Enfin, l'utilisation de XOS dans la synthèse de copolymères est un enjeu actuel ayant pour but d'obtenir des polymères biocompatibles et bioactifs. Ce deuxième chapitre en propose donc l'obtention par hydrolyse acide contrôlée dans des conditions douces. Tout le défi réside en la synthèse d'oligomères avec une distribution étroite des masses molaires et présentant une structure bien définie. L'optimisation des conditions d'hydrolyse par la mise en place d'un plan d'expériences sera tout d'abord étudiée. La synthèse, la reproductibilité, et la caractérisation des oligomères ainsi obtenus seront ensuite développées.

Sommaire

Partie A.	107
Optimisation de l'hydrolyse en milieu acide dilué	107
I. Plan d'expériences	107
I.1. Mise en place du plan	107
I.2. Résultats	108
II. Optimisation de la concentration en acide et du temps d'hydrolyse	110
Partie B.	113
Production des xylo-oligosaccharides	113
I. Répétabilité de l'hydrolyse en milieu acide dilué	113
II. Purification des XOS par précipitation sélective	114
II.1. Effet du solvant	114
II.2. Effet de la concentration en XOS	116
Partie C.	118
Caractérisation des xylo-oligosaccharides	118
I. Analyse MALDI-TOF	118
II. Analyse structurale	119
II.1. Analyses RMN	120
II.2. Détermination de la position de l'unité MeGlcA	122
III. Comportement thermique	126
Conclusion	128
Références	129
Annexe du chapitre II	132
Étude de la reproductibilité pour la production de XOS	132
I. Expériences et analyses réalisées	132
II. Résultats	133

Partie A.

Optimisation de l'hydrolyse en milieu acide dilué

L'un des objectifs de ce travail de thèse a été la synthèse de xylo-oligosaccharides (**XOS**) d'un \overline{DP}_n proche de 10 par le biais d'un plan d'expériences pour déterminer les conditions optimales de l'hydrolyse en milieu acide dilué. L'optimisation a été réalisée avec le lot 2 de MGX. Le choix s'est porté sur l'hydrolyse acide pour des raisons de 'scale up' et d'industrialisation.

I. Plan d'expériences

I.1. Mise en place du plan

Pour les hydrolyses en milieu acide, la littérature décrit principalement l'utilisation de l'acide sulfurique mais aussi des acides chlorhydrique et trifluoroacétique [1]. L'acide sulfurique a été utilisé ici car c'est un acide très bon marché et le sulfate peut être éliminé par précipitation lors de la neutralisation à l'hydroxyde de baryum.

Un plan factoriel fractionné de 2^{n-1} a été mis en place. Ce type de plan permet d'étudier 2 niveaux (minimal et maximal) avec n facteurs et certaines de leurs interactions. Pour l'hydrolyse des xylanes, quatre facteurs ont été identifiés comme influant la réaction : la concentration en acide (x1), la quantité de MGX (x2), la durée de réaction (x3) et la température (x4), il s'agit donc d'un plan factoriel fractionné de 2^{4-1} (Tableau 1).

Les limites haute et basse de chaque facteur ont ensuite été fixées :

- Afin d'être dans des conditions douces et propices à l'hydrolyse, la limite haute en acide a été fixée à 1M et la limite basse à 0,5M.
- Concernant l'influence de la quantité de MGX, 0,5 g ou 1 g ont été hydrolysés à 50 g/L.
- La durée a été fixée à 30 ou 90 min,
- La température à 70 ou 90°C.

Toutes ces conditions limites et plus particulièrement la température - inférieure à 100°C - ont aussi été choisies pour rester en hydrolyse partielle contrôlée mais aussi pour limiter la

dégradation des xyloses en furfural [2,3]. Pour ne citer que quelques exemples, Lau *et al.* (2014) ont conclu qu'afin de limiter la dégradation des sucres lors d'une hydrolyse acide, il faut travailler à faible température (120-130°C) et à relativement fortes concentrations en acide (0,6-1,0 v/v%) [4]. Gonzalez *et al.* (1986) ont, quant à eux, montré que l'hydrolyse d'hémicelluloses de paille de blé menée à 0,2M d'H₂SO₄ à 90°C pendant 12 heures ne produisait pas de furfural [5]. Dans d'autres conditions douces (100°C à 0,25M d'H₂SO₄ pendant 30 min), Akpinar *et al.* (2009) n'ont détecté que 0,015 wt.% de furfural après l'hydrolyse de xylanes de tiges de tournesol [6].

Tableau 1. Mise en place du plan d'expérience 2⁴⁻¹ pour l'optimisation des conditions d'hydrolyse

	Exp. n°	Effet moyen	[acide]	MGX	t	T°C	Interactions		
			x1	x2	x3	x4≡123	12	13	23
Niveau -1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1
	2	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1
	3	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1
	4	1	1	1	-1	-1	1	-1	-1
	5	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1
	6	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1
	7	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1
Niveau +1	8	1	1	1	1	1	1	1	1
	Niveau +1		1 M	1 g	90 min	90°C			
	Niveau -1		0,5 M	0,5 g	30 min	70°C			

I.2. Résultats

Trois réponses ont été identifiées comme importantes pour caractériser le produit d'hydrolyse et renseigner sur la performance de la réaction : la présence d'agrégats résiduels, la présence de MGX non hydrolysés et la présence de monomères (xylose), en sus des XOS. Ces trois réponses ont été mesurées, sur les chromatogrammes résultant d'analyses en SEC à détection RI, en relatif par rapport à l'obtention de XOS (deux chromatogrammes représentatifs de tous ceux obtenus pour chaque produit d'hydrolyse sont présentés (Figure 1):

- y1 est le ratio entre la hauteur du pic des agrégats et celle des XOS,
- y2 est le ratio entre celle des MGX restants et celle des XOS,

- y_3 est le ratio entre les hauteurs du pic des unités xylose et de celui des XOS.

Les valeurs obtenues sont alors ajoutées au plan d'expérience (Tableau 2) permettant le calcul des coefficients 'bx' pour chaque réponse, reflétant l'impact de chaque paramètre x sur la réponse Y. Le plan fractionnaire est associé à un modèle pour chaque réponse, Y_n , de la forme :

$$Y_n = b_0 + b_1.x_1 + b_2.x_2 + b_3.x_3 + b_4.x_4 + b_{12}.x_1.x_2 + b_{13}.x_1.x_3 + b_{23}.x_2.x_3$$

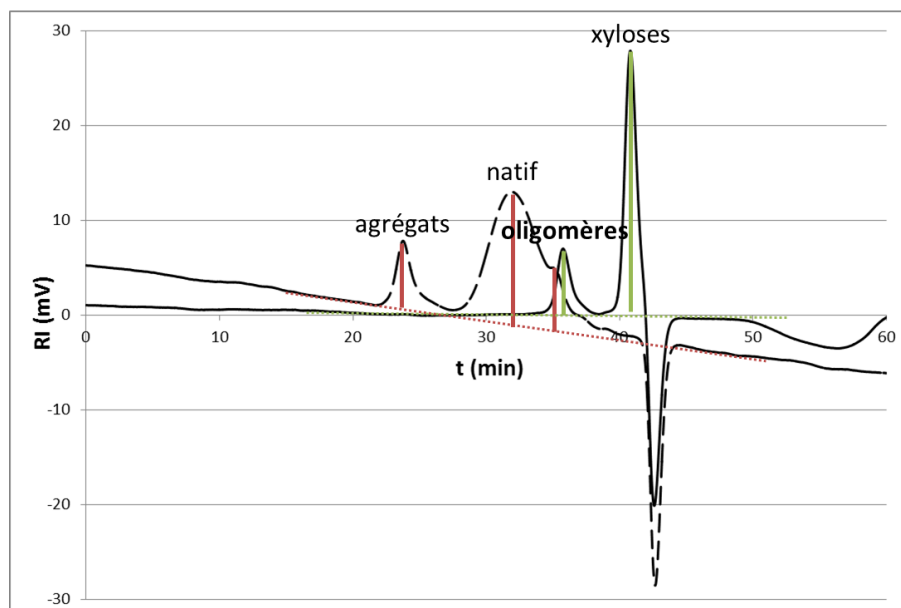


Figure 1. Chromatogrammes SEC-RI des produits d'hydrolyse qui sont représentatifs de tous ceux obtenus pour toutes les hydrolyses du plan d'expérience

Tableau 2. Plan d'expérience 2^{4-1} final pour l'optimisation des conditions d'hydrolyse

Exp. n°	moyen	[acide]	MGX	t	T°C						
		x1	x2	x3	x4≡123	12	13	23	Y1	Y2	Y3
1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1,45	2,05	0,00
2	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	0,00	0,00	0,75
3	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	0,00	0,27	0,31
4	1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	0,05	1,15	0,10
5	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	0,00	0,00	0,77
6	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	0,00	0,00	0,39
7	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1,05	1,18	0,11
8	1	1	1	1	1	1	1	1	0,18	0,00	1,61
	b0	b1	b2	b3	b4	b12	b13	b23			
Y1	0,34	-0,29	0,33	-0,03	-0,30	0,08	0,07	0,33			
Y2	0,58	-0,29	0,23	-0,29	-0,51	0,22	0,00	0,23			
Y3	0,50	0,21	0,11	0,21	0,35	0,12	0,07	0,11			

Ce plan d'expérience montre que tous les paramètres étudiés ont un effet non négligeable sur l'efficacité de l'hydrolyse. Néanmoins, le paramètre le plus critique est la température avec des coefficients de réponse compris entre 0,30 et 0,51 en valeur absolue. En sus de modifier la cinétique, la température peut affecter la sélectivité de l'hydrolyse [1]. Pour la suite de l'étude, la température a été fixée à 90°C.

Il est intéressant de noter que l'hydrolyse suit un modèle non linéaire qui s'explique par la présence d'agrégats en surcroît des MGX bien solubilisés dans le milieu acide : l'hétérogénéité du substrat conduit à des fractions 'rapidement' et 'lentement' hydrolysables [7–9]. Il est vraisemblable que la vitesse d'hydrolyse des MGX solubilisés soit supérieure à celles des agrégats. Ces deux populations suivent alors deux cinétiques différentes, conduisant ainsi à une réponse complexe. Pour limiter ce phénomène, la suite de l'étude sera réalisée sur 500 mg de MGX. Ce qui permettra aussi de faire des économies de matière.

II. Optimisation de la concentration en acide et du temps d'hydrolyse

Suite à ce plan d'expériences, l'étude de l'effet de la durée d'hydrolyse sur 500 mg de MGX à 0,7 M d'acide sulfurique à 90°C a été approfondie. Différentes durées d'hydrolyse entre 10 et 120 minutes ont été testées et chaque produit d'hydrolyse a été analysé par SEC à détection RI (calibrage pullulane, Figure 2). Ces analyses ont permis de déterminer la valeur de la masse molaire en fonction du temps mais aussi d'estimer la production de xylose au cours du temps d'hydrolyse (Figure 3). Cette production a été estimée par le rapport entre la hauteur du pic des xyloses sur celle du pic des XOS.

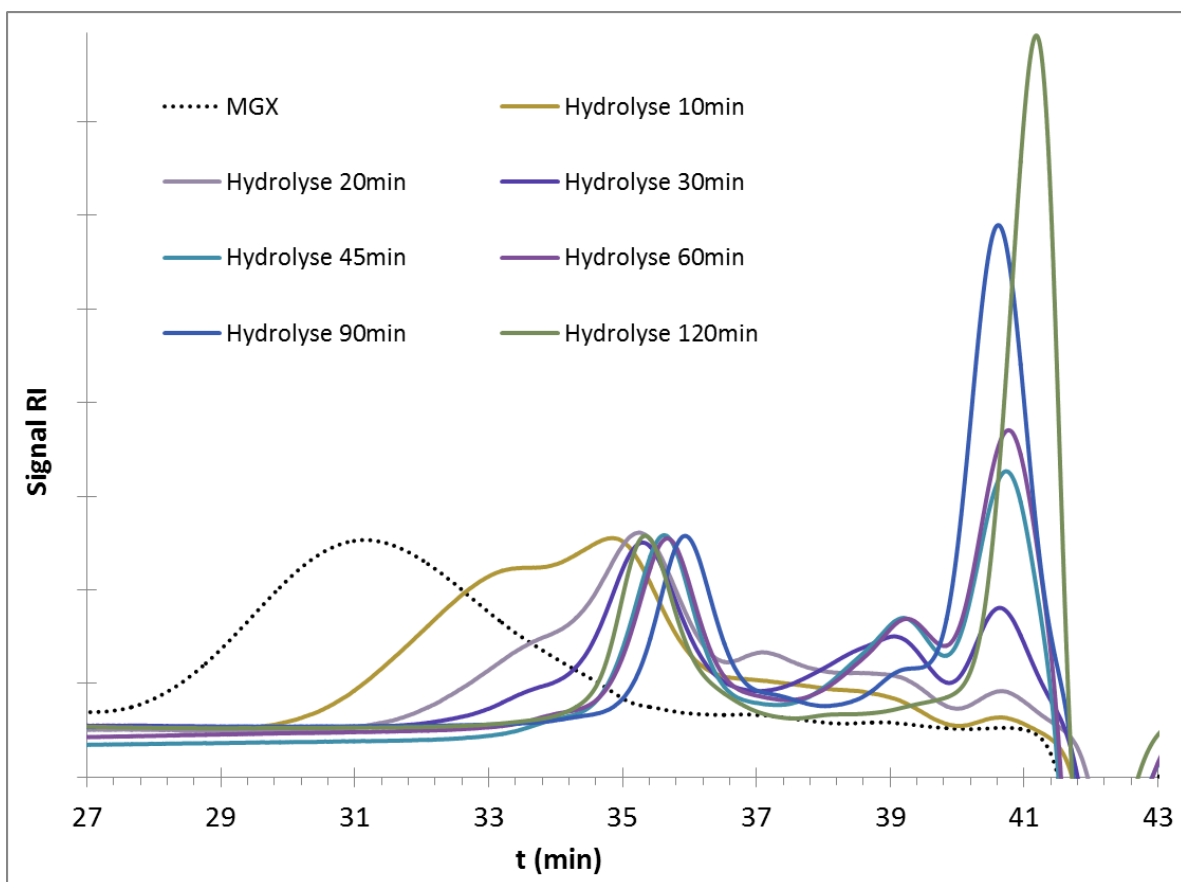


Figure 2. Chromatogrammes SEC-RI des produits d'hydrolyse du 4-O-methylglucuronoxylan à différents temps

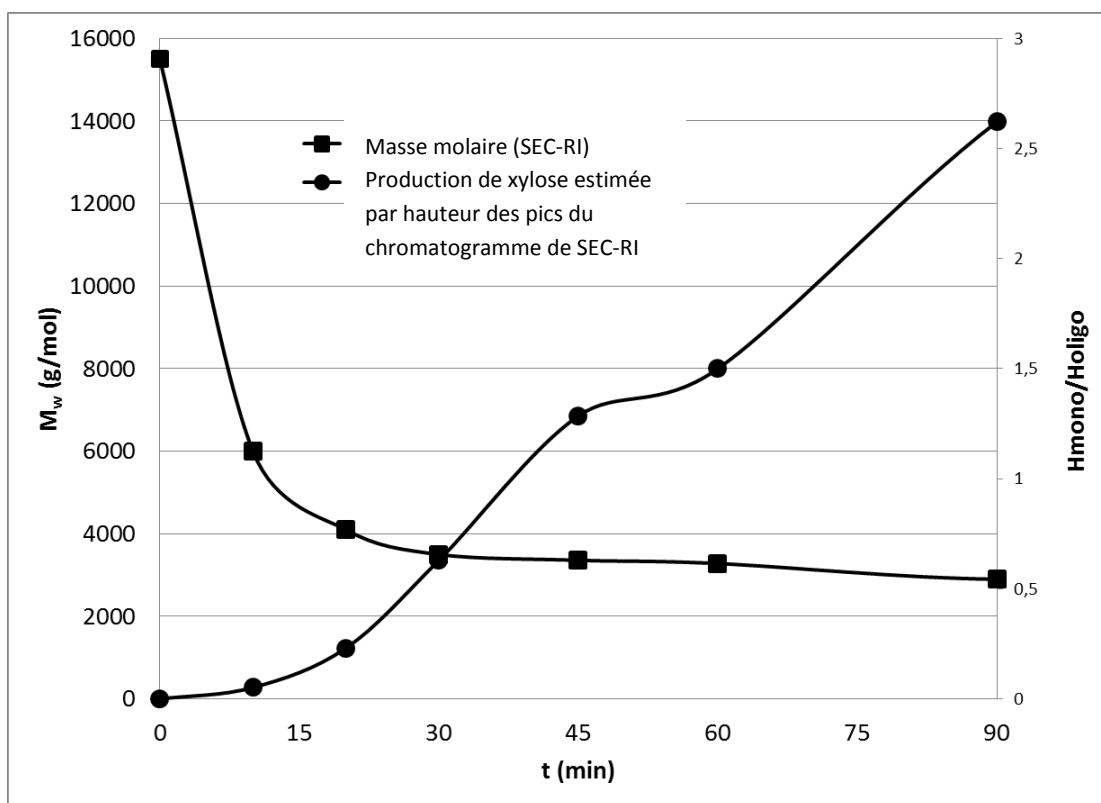


Figure 3. Effet de la durée d'hydrolyse sur la masse molaire et la production de xylose

Un comportement non linéaire du processus d'hydrolyse est observé :

- Lors des 45 premières minutes, la production de xylose s'accompagne d'une baisse de la masse molaire jusqu'à un plateau, permettant ainsi l'accès à des XOS de masse molaire proche de 3000 g/mol (calibrage pullulane).
- Les XOS qui présentent une certaine stabilité dans ces conditions d'hydrolyse pendant une certaine plage de temps sont ensuite totalement dégradés (à nouveau, production de xylose). Il est probable que la structure moléculaire particulière de ces XOS possédant des unités MeGlcA leur permet de résister à ces conditions d'hydrolyse. Ce n'est probablement qu'après l'hydrolyse d'une liaison clé que leur dégradation complète s'opère rapidement dans un second temps.

Comme il a été montré par Zhao *et al.* (2012), l'hydrolyse des xylanes se produit bien en deux étapes en conditions douces : le squelette des MGX est tout d'abord hydrolysé en XOS, suivi de l'hydrolyse des XOS en xyloses [10].

Les mêmes effets ont été observés en faisant varier la concentration en acide. A savoir qu'une augmentation du temps d'hydrolyse à concentration en acide fixée a le même effet qu'une augmentation de la concentration en acide pour la même durée d'hydrolyse. La présence de XOS de masse molaire proche de 3000 g/mol est retrouvée. Les différents résultats obtenus en faisant varier la concentration en acide de 0,1 M à 1 M à différents temps d'hydrolyse ne seront donc pas développés.

Ces conditions d'hydrolyse se sont donc avérées très intéressantes pour l'obtention de XOS de faible masse molaire. De façon surprenante, ces derniers s'avèrent particulièrement stables dans ces conditions d'hydrolyse, phénomène que nous tenterons d'expliquer (voir Partie C, III.2 de ce même chapitre). En conclusion, cette étude a montré que les meilleures conditions d'hydrolyse pour obtenir des XOS de faible masse molaire sont 0,7 M d'acide sulfurique sur 500 mg de MGX à 50 g/L pendant 45 minutes à 90°C. Le temps optimum a été déterminé comme étant celui pour lequel le rendement en XOS est maximum, juste au début du ralentissement de la production en xylose. C'est aussi le temps minimal pour lequel les XOS ainsi obtenus ont la plus faible distribution en taille (analyse SEC à détection RI).

Partie B.

Production des xylo-oligosaccharides

Une fois les conditions optimales déterminées, l'hydrolyse a été répétée plusieurs fois avec le lot 2 afin de tester la répétabilité des conditions opératoires. Pour tester la reproductibilité de l'hydrolyse, cette dernière a également été testée sur différents lots de MGX caractérisés dans le chapitre I. L'étude de reproductibilité se trouve dans la partie annexe du chapitre II.

I. Répétabilité de l'hydrolyse en milieu acide dilué

L'hydrolyse sur 500 mg de MGX à 0,7M d'acide sulfurique à 90°C pendant 45 minutes a été reproduite 15 fois. Il a ainsi été montré que le procédé est répétable avec un rendement moyen de 76,4 % (déviations standard de 13,3 %). Chaque produit d'hydrolyse a été analysé par SEC-RI et le même profil a été observé, à savoir un chromatogramme multimodal comme indiqué ci-dessous (Figure 4).

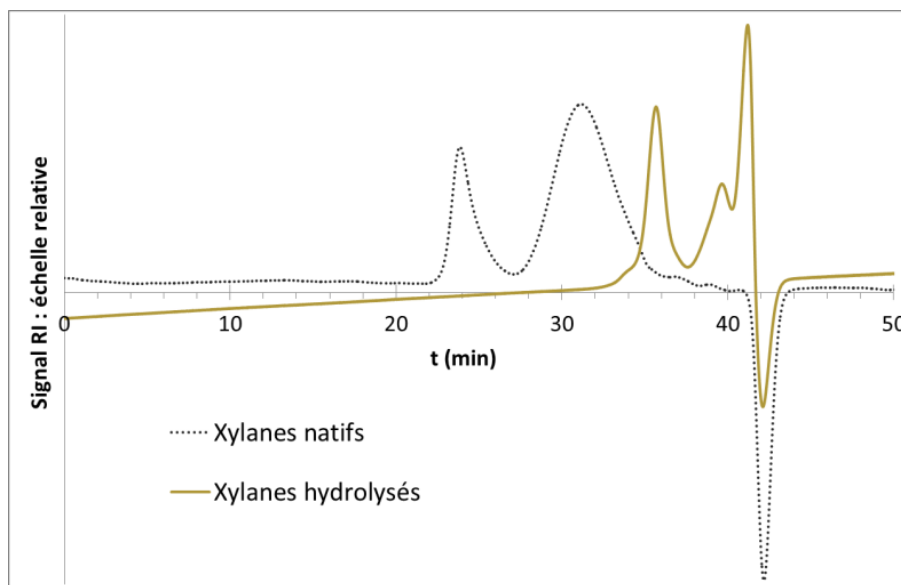


Figure 4. Chromatogrammes SEC-RI des 4-O-methylglucuronoxylanes et du produit d'hydrolyse

La première population dont le temps d'élution est à 36 minutes correspond aux XOS recherchés avec une masse molaire d'environ 3000 g/mol (calibrage pullulane).

Le pic à 41 min d'élution est attribué au xylose libéré pendant l'hydrolyse comme il a pu être vérifié en analysant, dans les mêmes conditions, des xyloses de référence. Le dernier pic, à 39

minutes, est supposé correspondre à l'élution du dimère composé d'un MeGlcA lié à une unité xylose. En effet, la présence de ce dimère dans des produits d'hydrolyse a déjà été observé car la liaison α entre le xylose et le MeGlcA est bien plus résistante à l'hydrolyse acide que la liaison β , expliquant la présence de ce dimère dans le produit d'hydrolyse [11–14].

Sur ce produit d'hydrolyse, la présence de furfural a été évaluée en suivant la norme AFNOR NF T12-008 [15] avec la mesure de l'absorbance à 277 nm. Le pourcentage de furfural dans le produit d'hydrolyse a été déterminé à 0,01 wt.%. Notons qu'il sera éliminé pendant le procédé de purification des oligomères.

II. Purification des XOS par précipitation sélective

Les XOS ont ensuite été purifiés par précipitation sélective dans des milieux eau/solvant en cherchant un procédé simple, transposable à plus grande échelle pour la production d'oligomères. L'effet de la polarité du solvant ainsi que l'effet de la concentration en produit d'hydrolyse sur la purification ont été étudiés.

II.1. Effet du solvant

Les solvants les plus adaptés pour une précipitation sélective des polysaccharides sont les alcools. Trois alcools ont été comparés, le méthanol (**MeOH**), l'éthanol (**EtOH**) et l'isopropanol (**iPrOH**), dans le but d'étudier l'effet de la polarité sur la solubilité des XOS. Dans l'ordre croissant, iPrOH a une polarité de 0,546, EtOH de 0,654 et MeOH de 0,762 [16]. Tous les essais ont été réalisés à 10 g/L. L'alcool est ensuite ajouté au mélange jusqu'à des taux de 70, 80 ou 90 vol.%. Le mélange est ensuite agité 20h puis centrifugé. La purification est alors répétée à l'identique une seconde fois. Finalement, le produit est analysé par SEC-RI. L'exemple de la purification par iPrOH est présenté Figure 5.

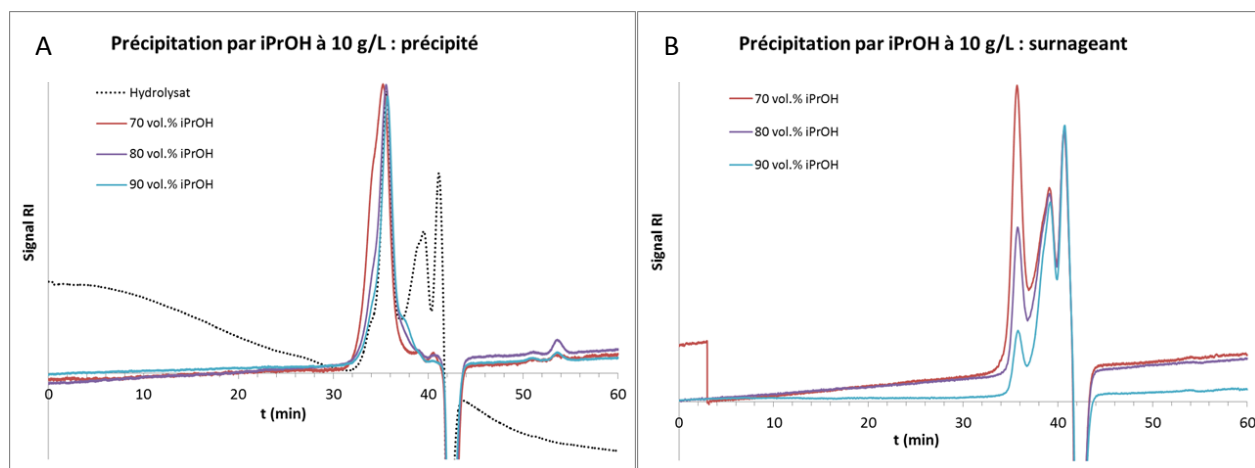


Figure 5. Analyse par SEC-RI des XOS précipités (A) et du surnageant (B) dans des mélanges eau/iPrOH à différents taux d'iPrOH, 70 vol.% en rouge, 80 vol.% en violet et 90 vol.% en bleu

L'analyse par SEC des XOS précipités (Figure 5, A) montre que ces derniers sont exempts de xyloses et de dimères. La distribution en taille des XOS est plus resserrée pour les taux de 80 et 90 vol.% en iPrOH. L'analyse du surnageant renseigne sur le rendement de la purification dans la mesure où ce dernier contient lui aussi des XOS (Figure 5, B). Plus le pourcentage d'alcool ajouté est élevé, moins les XOS sont solubles dans le surnageant. Cela s'observe pour les trois alcools étudiés comme il est montré ci-après pour des teneurs en alcool de 90 vol.% (Figure 6).

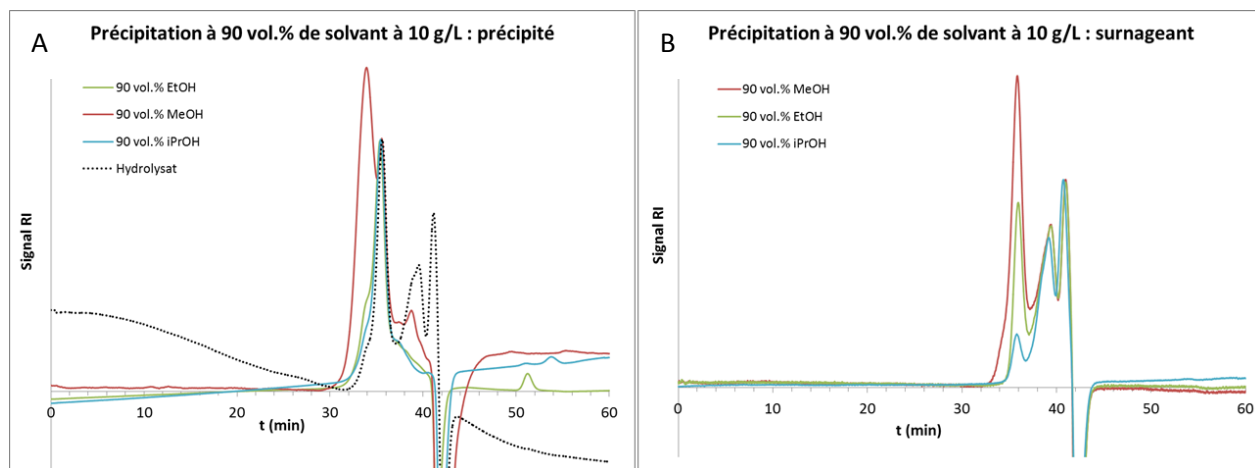


Figure 6. Analyse par SEC-RI des XOS précipités (A) et du surnageant (B) dans des mélanges eau/alcool à 90 vol.% avec le MeOH en rouge, l'EtOH en vert et l'iPrOH en bleu

Au regard de l'analyse des précipités, (Figure 6, A), un comportement particulier est observé dans le cas du méthanol. En effet, une quantité encore importante de dimère est présente dans le précipité et le pic des XOS fait apparaître un dédoublement difficilement explicable. Il est envisageable que dans le mélange eau/MeOH, les XOS s'agrègent entre eux ce qui se traduirait

par une élution à un volume hydrodynamique plus important en analyse SEC. Le MeOH n'est donc pas un solvant adapté pour la précipitation des XOS.

L'iPrOH et l'EtOH donnent quant à eux des résultats similaires : les XOS précipités (Figure 6, A) sont exempts de xyloses et de dimères et leur distribution en taille est resserrée. Concernant le rendement de purification (Figure 6, B), l'iPrOH entraîne beaucoup moins de XOS dans le surnageant que l'EtOH. Néanmoins, pour des raisons de coûts et de toxicité, l'EtOH a été choisi pour la purification des XOS à plus grande échelle. Pour tenter d'améliorer l'efficacité du procédé, l'effet de la concentration initiale en produit d'hydrolyse a été étudié.

II.2. Effet de la concentration en XOS

Les expériences ont été réalisées dans des mélanges eau/EtOH à 90 vol.% en EtOH pour des concentrations initiales en produit d'hydrolyse de 10, 20, 50 et 100 g/L. Les précipités et surnageants ont ensuite été analysés par SEC. Les chromatogrammes des précipités donnent tous des pics de faible dispersité, preuve de l'efficacité de la purification. Afin d'estimer le rendement de la purification, les surnageants ont été analysés (Figure 7). Plus la concentration initiale en produits d'hydrolyse est élevée, moins les XOS sont perdus dans le surnageant. Par conséquent, la concentration de 100 g/L a été sélectionnée pour le reste de l'étude.

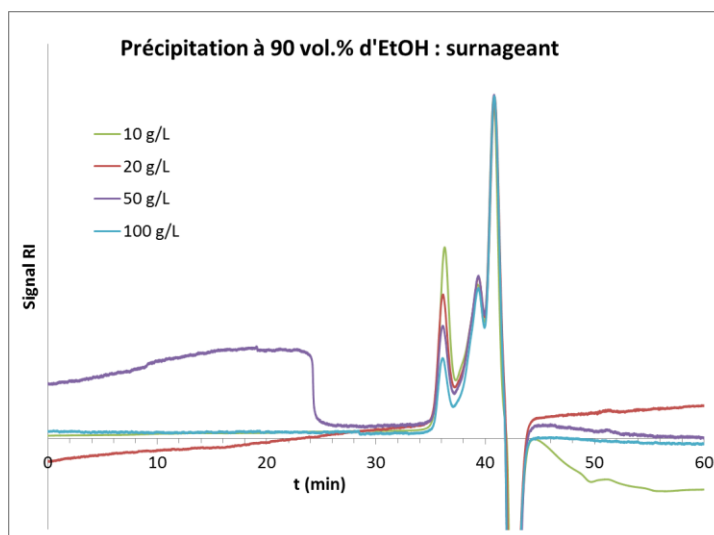


Figure 7. Analyse par SEC-RI du surnageant dans des mélanges eau/EtOH à 90 vol.% d'EtOH avec une concentration initiale des XOS dans l'eau de 10 g/L en vert, de 20 g/L en rouge, de 50 g/L en violet et de 100 g/L en bleu

Les XOS ont donc été purifiés par précipitation sélective dans des mélanges eau/EtOH (100 g/L à 90 vol.% d'éthanol) et représentent en moyenne 22,1 % (déviations standard de 7,7 %) de la masse totale de MGX utilisée pour l'hydrolyse. La masse molaire des XOS mesurée par SEC à détection RI (calibrage pullulane) est autour de 3000 g/mol (Figure 8).

Notons que ce rendement moyen est tout à fait honorable. Une étude d'Akpınar et al. (2009) portant également sur la synthèse de XOS par hydrolyse acide énonce un rendement maximal de 13% [6].

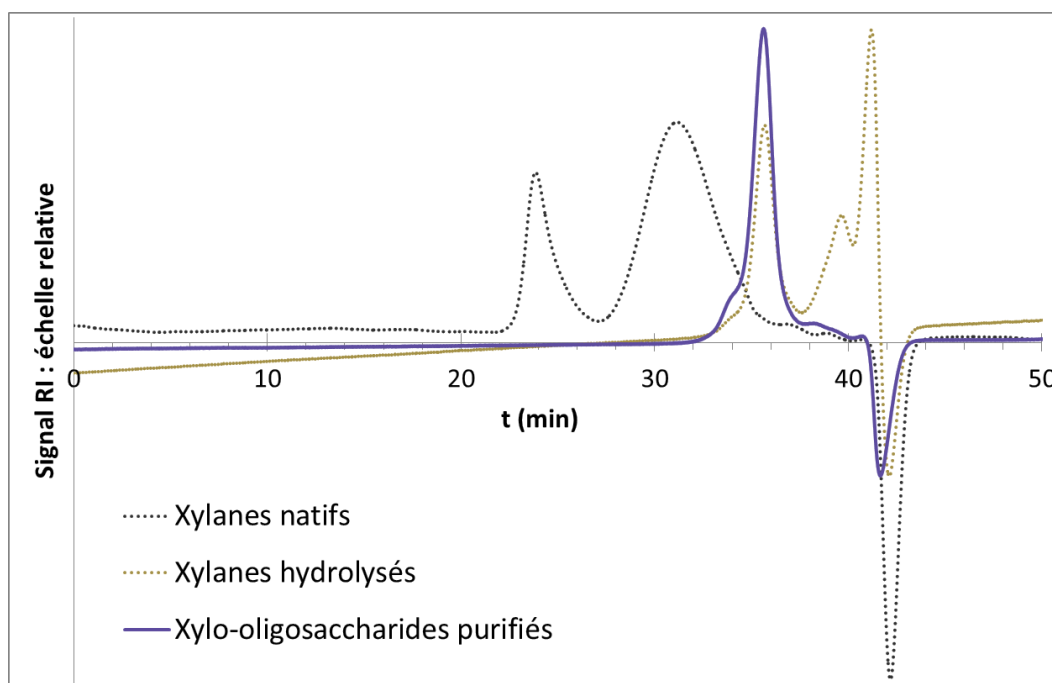


Figure 8. Chromatogrammes SEC-RI des 4-O-méthylglucuronoxylanes (courbe noire pointillée), du produit d'hydrolyse (courbe jaune or pointillée) et des oligomères purifiés (courbe en trait plein violet)

Partie C.

Caractérisation des xylo-oligosaccharides

La caractérisation complète des XOS obtenus à partir du lot 2 a été effectuée par des analyses MALDI-TOF, TGA, DSC et RMN en sus des analyses SEC décrites en partie B. Afin de déterminer la position des unités MeGlcA, une technique plus originale, basée sur la réaction de peeling, a été développée.

I. Analyse MALDI-TOF

La masse molaire des XOS a déjà été estimée par SEC à détection RI avec un calibrage pullulane. Cependant le calibrage pullulane surestime les masses molaires et les XOS ont une taille trop petite pour être détectés par MALLS. Une analyse MALDI-TOF des XOS a donc été réalisée (Figure 9), à la fois pour avoir une autre estimation de la masse molaire des XOS mais surtout pour savoir quelles populations sont présentes dans l'échantillon.

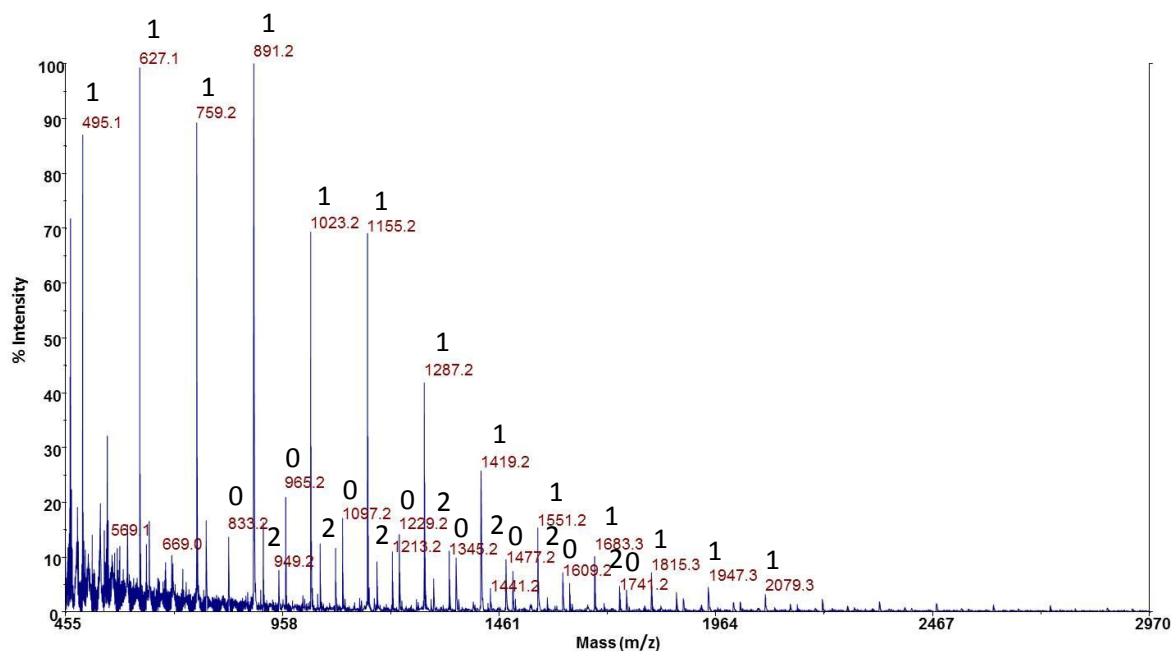


Figure 9. Spectre MALDI-TOF des oligomères avec trois séries superposées notées 0, 1 et 2 selon leur nombre d'unité(s) MeGlcA par chaîne

Le spectre MALDI-TOF montre que l'échantillon présente une dispersité élevée avec plusieurs populations. En effet, les valeurs exactes de masse permettent de trouver à quelle population correspond un pic : un homoxylane comprenant n xyloses ou un MGX possédant m MeGlcA. Dans une même population, la différence entre deux pics adjacents correspond alors à 132,0 unités de masse soit une unité anhydroxylose.

Par exemple, pour le pic à 1023,2 g/mol :

$$1023,2 = n * 132,0 + m * 190,0 + 18,0 + 22,99$$

Où, n est le nombre unités anhydroxylose et 132,0 sa masse,

m est le nombre d'unités MeGlcA et 190,0 sa masse,

18,0 est la masse du bout de chaîne

Et 22,99 est la masse de l'adduit, ici le sodium.

Le pic à 1023,2 correspond donc à une chaîne de 6 unités anhydroxylose avec 1 unité MeGlcA.

Chaque pic a ainsi pu être identifié par sa masse exacte et est notés 0, 1 ou 2 selon le nombre d'unité(s) MeGlcA. La série 0 correspond à des homoxylanes avec un \overline{DP}_n entre 4 et 13. La série 1 correspond à des XOS n'ayant qu'une seule ramification MeGlcA et un \overline{DP}_n allant de 2 à 14. Enfin la série 2 correspond à des XOS possédant deux ramifications avec un \overline{DP}_n allant de 4 à 10. Pour des masses molaires supérieures à 2100 g/mol, il est difficile de différencier chaque série.

La population la plus représentée dans l'échantillon est du 4-*O*-methylglucuronoxylane contenant entre 2 et 8 unités xylose et 1 seule ramification. Dans la suite de l'étude (Partie C, III.2), une tentative pour déterminer la position de cette unique unité MeGlcA a été entreprise.

II. Analyse structurale

Des analyses RMN ont été réalisées afin de confirmer que les XOS sont bien de type 4-*O*-methylglucuronoxylane mais aussi de calculer le ratio moyen d'unités xylose par MeGlcA. La position de la ramification MeGlcA sera ensuite déterminée par peeling suivi d'une analyse SEC-RI.

II.1. Analyses RMN

Les spectres RMN du proton et du carbone (Figure 10) montrent un groupe de signaux principaux, attribuables aux unités xylose non ramifiées, dont les déplacements chimiques sont résumés Tableau 3 [17–19].

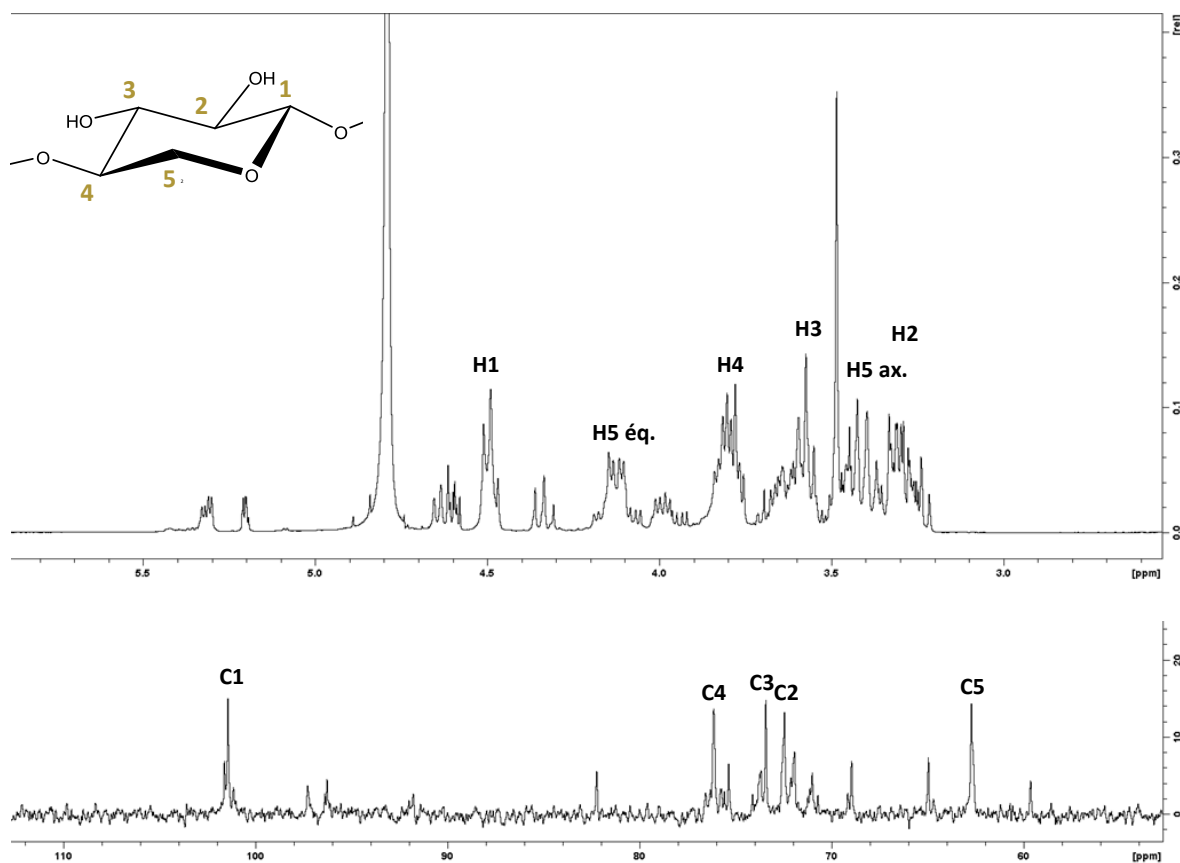


Figure 10. Spectres RMN ¹H et ¹³C des xylooligosaccharides dans D₂O

Tableau 3. Récapitulatif des déplacements chimiques ¹H et ¹³C des principaux signaux correspondant aux unités xylose non ramifiées

	Position	¹ H δ (ppm)	¹³ C δ (ppm)
Unité xylose non ramifié MeGlcA	1	4,49	101,6
	2	3,30	72,6
	3	3,57	73,6
	4	3,80	76,3
	5 _{équatorial} /5 _{axial}	4,13/3,40	62,8

Les autres signaux ont pu être attribués grâce à une analyse en HSQC (corrélation proton/carbone, Figure 11). Il est alors possible de discerner deux autres types de signaux correspondant d'une part aux unités xylose qui sont substituées par un MeGlcA et d'autre part aux unités MeGlcA elles-mêmes [17–19]. Finalement, les signaux à 5,2 et 4,6 ppm en RMN du proton et 92,0 et 96,5 ppm en RMN du carbone, correspondent aux formes α et β de résidus xylose libérés pendant l'hydrolyse et qui n'ont pas été éliminés pendant le processus de purification.

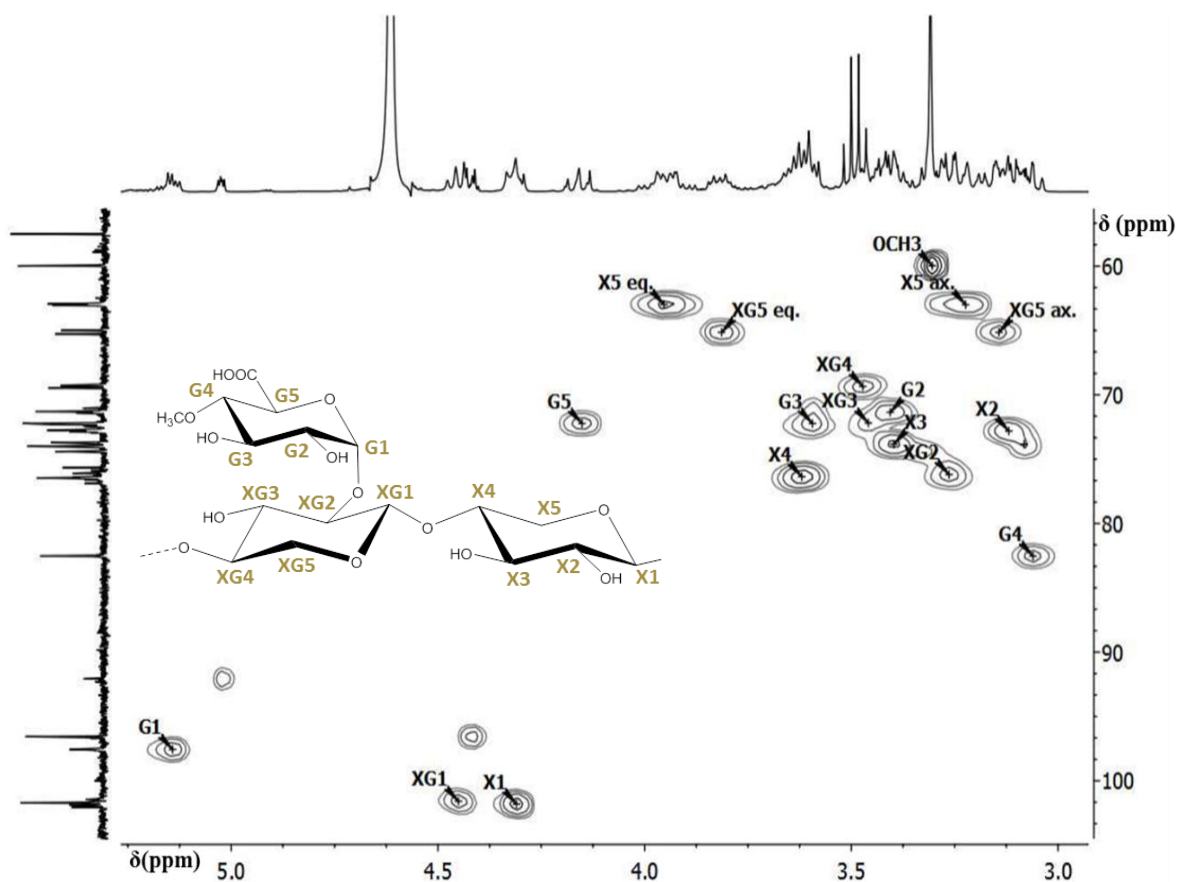


Figure 11. Spectre RMN HSQC des xylooligosaccharides dans D_2O avec, X pour unité xylose non ramifiée, XG pour unité xylose ramifiée et G pour l'unité MeGlcA

De la même façon que pour le MGX natif, la proportion des MeGlcA par rapport aux unités xylose a pu être déterminée par intégration des signaux des H1 : il y a en moyenne 4 unités xylose pour 1 MeGlcA. Ce rapport est trois fois inférieur à celui obtenu pour le MGX natif (12 :1). En effet, les liaisons β -1,4 entre deux xyloses sont peu résistantes à l'hydrolyse acide en conditions douces en comparaison des liaisons en α avec les MeGlcA [12].

II.2. Détermination de la position de l'unité MeGlcA

L'analyse des oligomères par spectrométrie MALDI-TOF a montré que la majorité des XOS ne possède qu'une seule unité MeGlcA par chaîne. Il est donc intéressant de déterminer la position de cette unité qui peut être soit sur une position aléatoire dans la chaîne des XOS, soit sur une position particulière de la chaîne, *i.e.* extrémité réductrice ou non réductrice. Pour cela, une réaction de peeling primaire a été réalisée. En effet, à des températures inférieures à 100°C, le peeling primaire permet de raccourcir la chaîne seulement par l'extrémité réductrice, une seule unité xylose à la fois. Notons qu'à plus fortes températures, le peeling secondaire (hydrolyse basique) se produit et coupe la chaîne de façon aléatoire. Par conséquent, pour limiter le peeling secondaire la réaction de peeling a été réalisée à 43°C [20].

Pour mieux comprendre la réaction de peeling, le mécanisme est présenté Figure 12. La réaction débute par une isomérisation de l'extrémité réductrice sous catalyse basique avec la formation d'un enediol (**2**). Cet enediol est en équilibre avec la structure 2-keto (**3**) qui fait alors l'objet d'une β -hydroxy élimination en position C4, qui induit l'élimination d'une unité xylose de la chaîne par l'extrémité réductrice (5). Cette réaction conduit à la libération d'un coproduit instable qui va se dégrader [21]. Dès que l'extrémité réductrice est ramifiée en C2, la formation de la structure 2-keto est impossible, et le peeling par l'extrémité réductrice est alors stoppé [20,22].

L'analyse en SEC des produits du peeling permet alors de déterminer la position de la ramification. En effet, comme l'illustre la Figure 13, suivant la position de la ramification MeGlcA, les produits de réaction seront de masses molaires très différentes et différenciables par analyse SEC.

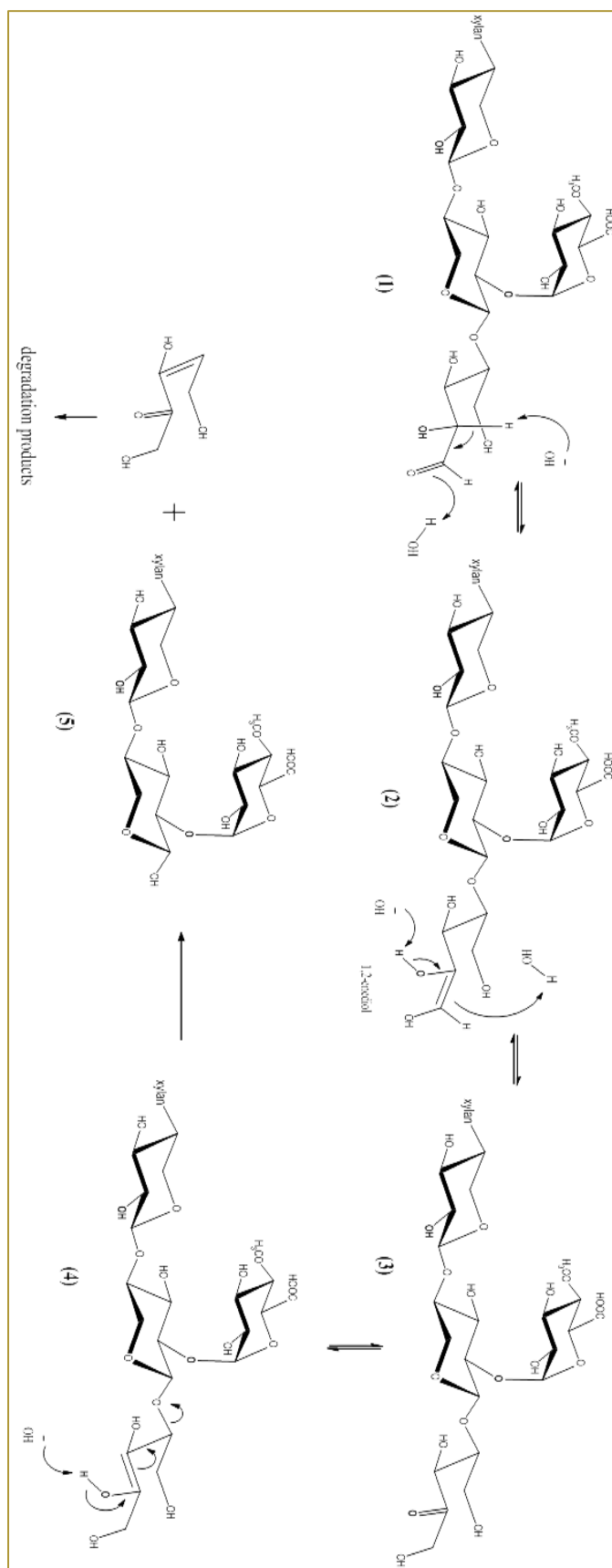


Figure 12. Mécanisme de la réaction de peeling.

Adapté de Sixta et al., 2008 [21]

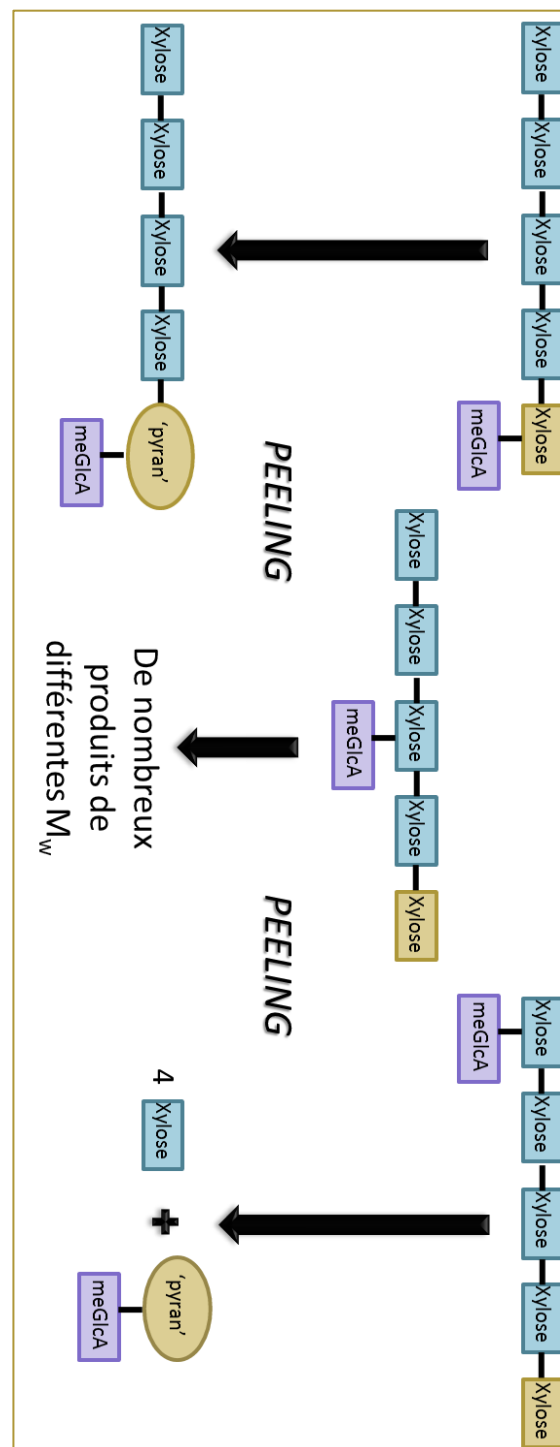


Figure 13. Schématisation des différents scénarii possibles pour la réaction de peeling suivant la position du motif MeGlcA

Après la réaction de peeling, les produits de réaction ont donc été analysés par SEC à détection RI (Figure 14). Le profil du chromatogramme montre deux signaux distincts. Le signal à 42 minutes correspond à l'élution des produits de faible masse qui sont libérés pendant la réaction de peeling mais non différenciables par SEC. Le signal aux alentours de 38 minutes est supposé correspondre à l'élution du dimère composé d'un MeGlcA lié à une unité xylose. Le dédoublement de ce signal peut s'expliquer par la transformation de motifs MeGlcA en acides hexénuroniques, phénomène connu en milieu fortement basique [23]. En effet, en milieu basique, l'élimination de MeO-4 est favorisée et conduit à la formation de méthanol et d'acide hexénuronique par la formation d'une double liaison en position 4,5 [24] (Figure 15). Les produits du peeling se résument finalement aux monomères, sûrement dégradés, et aux dimères (Figure 13) : la seule ramification MeGlcA présente sur la chaîne se situe à l'extrémité non réductrice

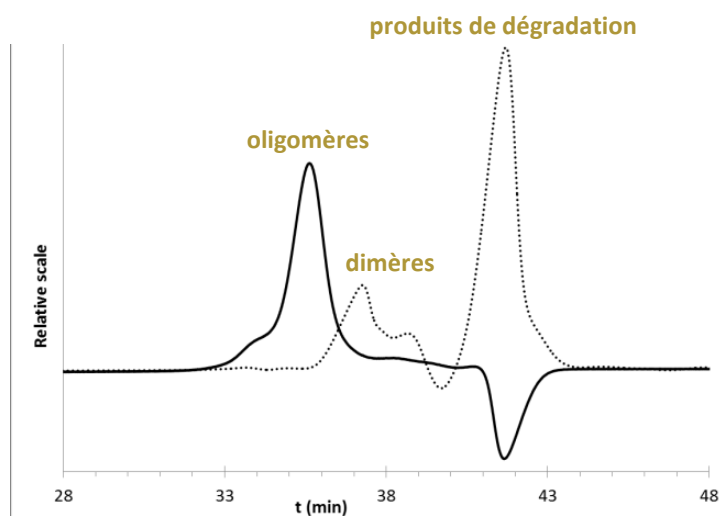


Figure 14. Chromatogrammes SEC-RI des xylo-oligosaccharides et du produit de peeling

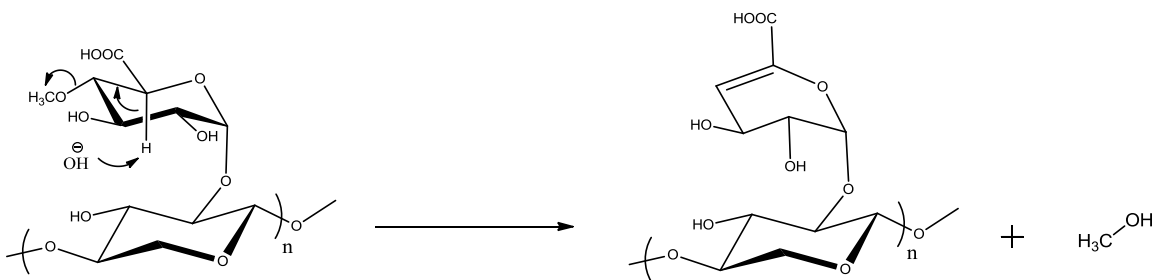


Figure 15. Formation de l'acide hexénuronique en conditions basiques

Finalement, l'ensemble des analyses effectuées permet de conclure à la synthèse de XOS bien définis ayant en moyenne six unités xylose par chaîne et seulement un motif MeGlcA situé à l'extrémité non réductrice (Figure 16).

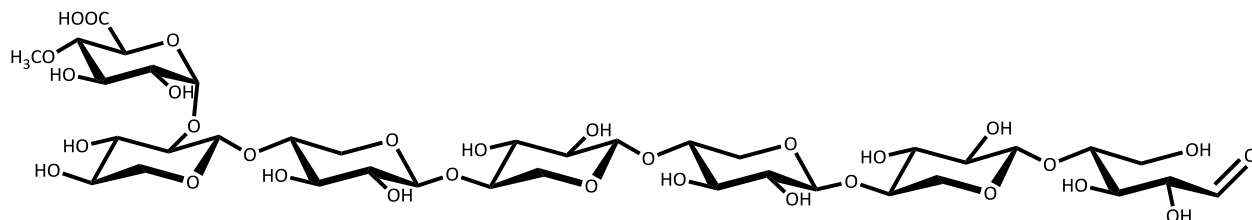


Figure 16. Structure hypothétique des 4-O-méthylglucuronoxyloligosaccharides obtenus par l'hydrolyse acide (H_2SO_4 0,7M, 45 min, 90°C) de xylanes de hêtre

Cette structure particulière des XOS pourrait permettre d'expliquer la stabilité de cette population à l'hydrolyse acide modérée des MGX (Partie A). Notre hypothèse se base sur des stabilités différentes des liaisons osidiques du squelette xylane à l'hydrolyse par un 'effet' du motif MeGlcA. La fonction acide carboxylique aurait une action catalytique accélérant l'hydrolyse de la liaison osidique adjacente entre deux unités xylose, du côté de l'extrémité non-réductrice, comme illustré Figure 17.

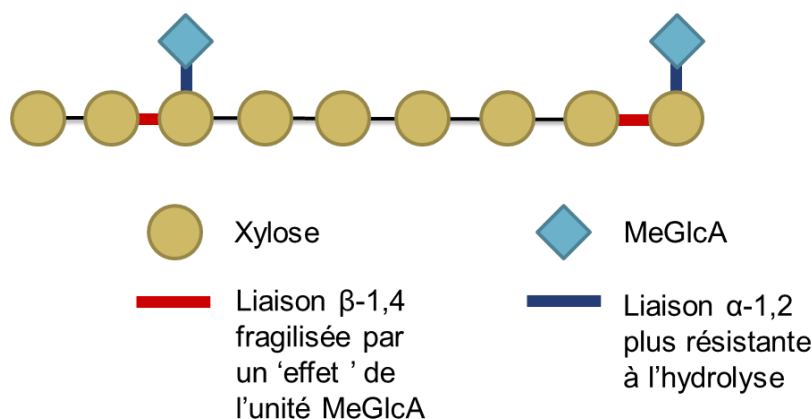


Figure 17. Illustration des stabilités relatives des liaisons osidiques à une hydrolyse acide modérée

Sachant que les unités MeGlcA ne sont pas distribuées aléatoirement mais plutôt régulièrement le long de la chaîne par blocs (Etude Bibliographique, Partie A, II.2) (Figure 18-a), il serait alors possible, dans des conditions d'hydrolyse adaptées, que les différentes cinétiques d'hydrolyse puissent s'exprimer distinctement pour obtenir les XOS avec une ramification à l'extrémité non-

réductrice (Figure 18-b). Une fois une liaison 'clé' rompue, les XOS s'hydrolysent alors rapidement en xyloses (Figure 18-c). Ceci est en accord avec la littérature selon laquelle en milieu acide dilué, l'hydrolyse conduit en début de réaction à la formation de XOS et qu'ensuite a lieu leur dépolymérisation en monomère [11,25].

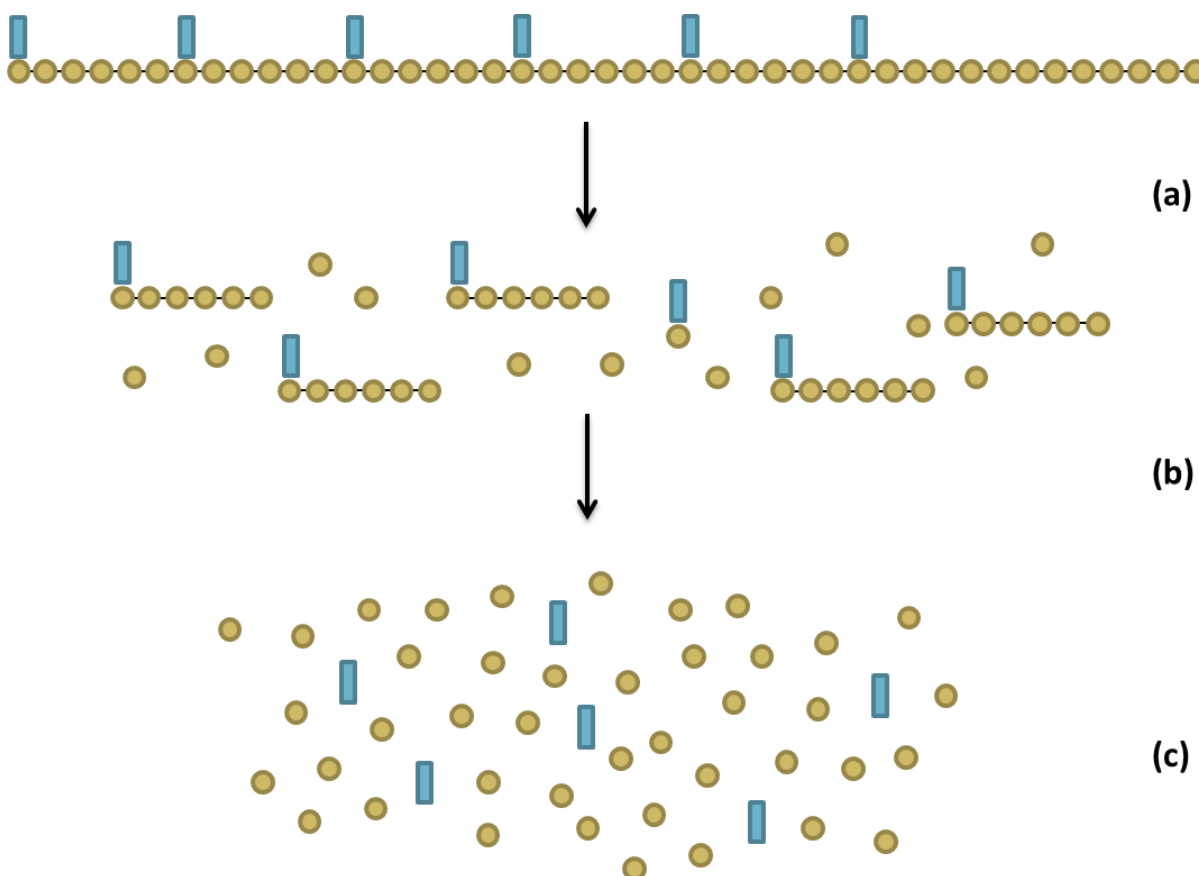


Figure 18. Schématisation de l'hydrolyse de MGX en conditions d'hydrolyse acide modérée

III. Comportement thermique

Les XOS ont ensuite été analysés par TGA et DSC pour voir un éventuel effet de l'hydrolyse sur leur comportement thermique. Le profil obtenu pour la dégradation thermique (Figure 19) est similaire à celui des MGX avant hydrolyse (Chapitre I, Partie A, IV.1). Toutefois, en comparaison avec les MGX, la présence d'eau au sein des XOS est plus significative (7% au lieu de 4%) et leur dégradation commence à plus basse température : 150°C au lieu de 180°C (Figure 19-a). Cet écart de température est également observé pour les températures maximales de dégradation des premiers maximum : 190°C au lieu de 228°C (Figure 19-b).

D'autre part, il existe pour les XOS une dégradation supplémentaire à 673°C correspondant à de l'oxyde de baryum résiduel suite à la dégradation du sulfate de baryum [26]. Ce qui est confirmé par le taux de résidu sous oxygène des XOS, 18,9%, qui est bien supérieur à celui des MGX, 5,2%.

Identiquement à l'analyse DSC des MGX, les XOS ne présentent aucune transition thermique avant leur dégradation.

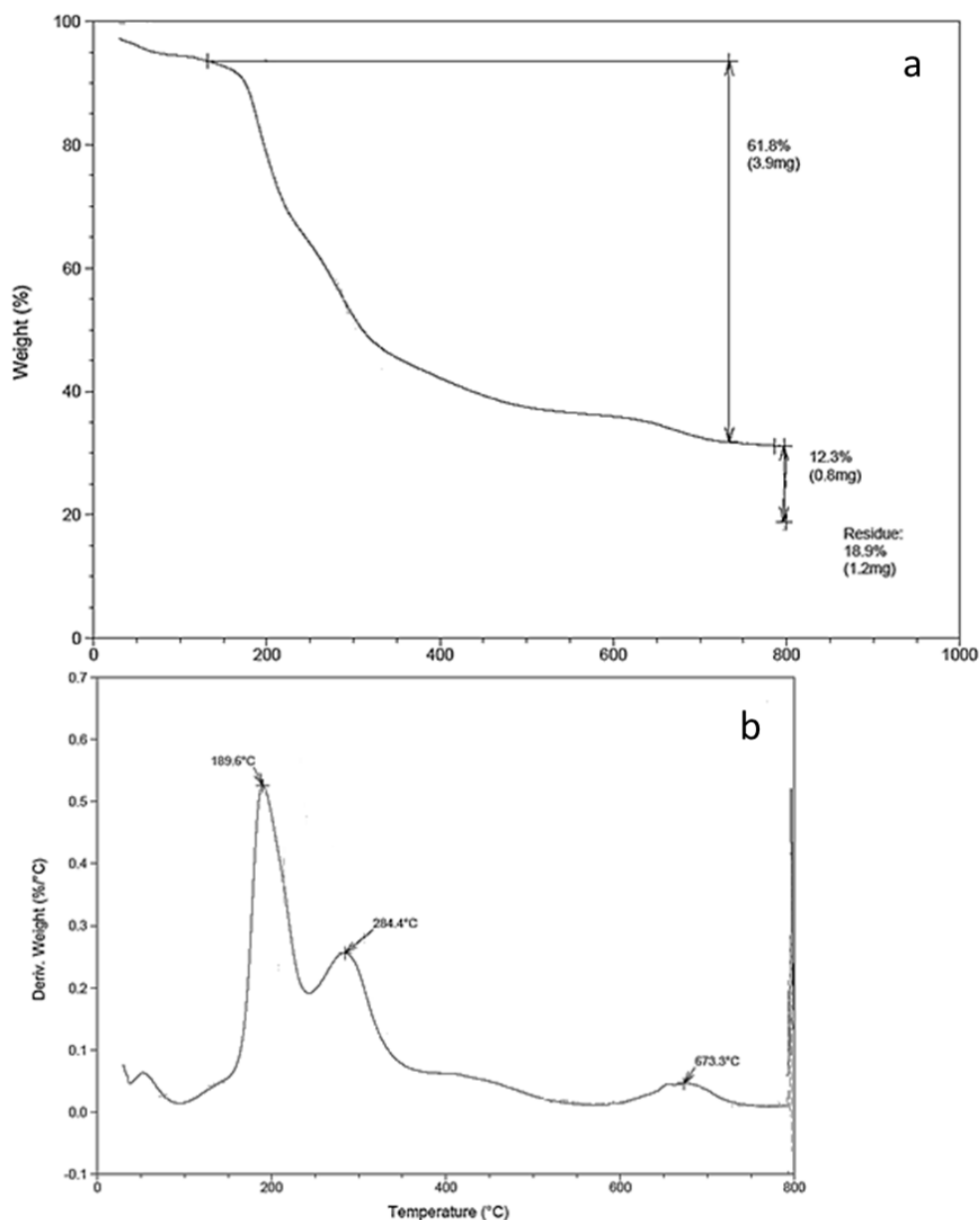


Figure 19. Analyse TGA des xylo-oligosaccharides avec masse (a) et dérivée de la masse (b) en fonction de la température (de 30°C à 800°C sous azote à 10°C/min puis mise sous oxygène)

Conclusion

Dans ce second chapitre, l'optimisation des conditions d'hydrolyse acide de xylanes de hêtre (lot 2) a été réalisée grâce à un plan d'expériences de type fractionné 2^{4-1} . L'étude de ce plan a montré que les agrégats de xylanes avaient une cinétique d'hydrolyse plus lente que celles des xylanes solubilisés et que la température de réaction était un paramètre déterminant à bien contrôler.

L'hydrolyse à 0,7 M d'acide sulfurique pendant 45 minutes à 90°C conduit à la synthèse de xylo-oligosaccharides (**XOS**) bien définis. Ces conditions d'hydrolyses ont été répétées et reproduites sur différents lots de MGX. Quel que soit le lot de MGX de départ utilisé, les XOS obtenus avec un rendement autour de 22 ± 6 %, possèdent une masse molaire comprise entre 1000 et 2000 g/mol, avec en majorité une seule ramification MeGlcA par chaîne. Ces résultats reflètent le potentiel d'une industrialisation pour la production de XOS bien définis par hydrolyse acide contrôlée.

Finalement, ces oligomères ont été caractérisés par SEC, RMN et MALDI-TOF permettant de conclure à un \overline{DP}_n d'environ 6 avec une seule unité MeGlcA par chaîne, positionnée à l'extrémité non-réductrice. De manière surprenante, l'étude de l'hydrolyse des xylanes en milieu acide dilué a permis l'obtention de XOS stables dans la gamme des conditions d'hydrolyse utilisée. La structure particulière de ces XOS pourrait expliquer la stabilité de cette population à l'hydrolyse acide modérée. Notre hypothèse se base sur des stabilités à l'hydrolyse différentes des liaisons osidiques par un 'effet' du motif MeGlcA. Il serait alors possible que les différentes cinétiques d'hydrolyse des différentes liaisons osidiques puissent s'exprimer distinctement. Le mécanisme permettant l'obtention de ces XOS particuliers reste néanmoins non élucidé.

Références

- [1] Mäki-Arvela P, Salmi T, Holmbom B, Willför S, Murzin DY. Synthesis of sugars by hydrolysis of hemicelluloses--a review. *Chemical Reviews* 2011;111:5638–66.
- [2] Dutta S, De S, Saha B, Alam MI. Advances in conversion of hemicellulosic biomass to furfural and upgrading to biofuels. *Catalysis Science & Technology* 2012;2:2025–36.
- [3] Danon B, Marcotullio G, de Jong W. Mechanistic and kinetic aspects of pentose dehydration towards furfural in aqueous media employing homogeneous catalysis. *Green Chemistry* 2014;16:39–54.
- [4] Lau C-S, Thoma GJ, Clausen EC, Carrier DJ. Kinetic Modeling of Xylose Oligomer Degradation during Pretreatment in Dilute Acid or in Water. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 2014;53:2219–28.
- [5] González G, López-Santín J, Caminal G, Solà C, Gonzalez G, J. L-S, et al. Dilute Acid Hydrolysis of Wheat Straw Hemicellulose at Moderate Temperature: A Simplified Kinetic Model. *Biotechnology and Bioengineering* 1986;XXVIII:288–93.
- [6] Akpinar O, Erdogan K, Bostanci S. Production of xylooligosaccharides by controlled acid hydrolysis of lignocellulosic materials. *Carbohydrate Research* 2009;344:660–6.
- [7] Esteghlalian A, Hashimoto AG, Fenske JJ, Penner MH. Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass. *Bioresource Technology* 1997;59:129–36.
- [8] Maloney MT, Chapman TW, Baker a J. Dilute acid hydrolysis of paper birch: kinetics studies of xylan and acetyl-group hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering* 1985;27:355–61.
- [9] Lavarack BP, Griffin GJ, Rodman D. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. *Biomass and Bioenergy* 2002;23:367–80.
- [10] Zhao X, Zhou Y, Liu D. Kinetic model for glycan hydrolysis and formation of monosaccharides during dilute acid hydrolysis of sugarcane bagasse. *Bioresource Technology* 2012;105:160–8.
- [11] Springer EL. Prehydrolysis of hardwoods with dilute sulfuric acid. *Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development* 1985;24:614–23.
- [12] Peng F, Peng P, Xu F, Sun R-CC. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. *Biotechnology Advances* 2012;30:879–903.

- [13] De Ruiter GA, Schols HA, Voragen AGJ, Rombouts FM. Carbohydrate analysis of water-soluble uronic acid-containing polysaccharides with high-performance anion-exchange chromatography using methanolysis combined with TFA hydrolysis is superior to four other methods. *Analytical Biochemistry* 1992;207:176–85.
- [14] Roy N, Timell TE. The acid hydrolysis of glycosides X. Hydrolysis of 2-O-(4-O-methyl- α -D-glucopyranosyluronic acid)-D-xylose and related disaccharides. *Carbohydrate Research* 1968;6:488–90.
- [15] AFNOR standard NF T 12-008. Determination of pentosan content. *Pulps* 1987.
- [16] Reichardt C. Appendix. Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2002, p. 471–507.
- [17] Habibi Y, Mahrouz M, Vignon MR. Isolation and structure of D-xylans from pericarp seeds of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. *Carbohydrate Research* 2002;337:1593–8.
- [18] Bian J, Peng F, Peng X-P, Xu F, Sun R-C, Kennedy JF. Isolation of hemicelluloses from sugarcane bagasse at different temperatures: Structure and properties. *Carbohydrate Polymers* 2012;88:638–45.
- [19] Moine C, Krausz P, Chaleix V, Sainte-Catherine O, Kraemer M, Gloaguen V. Structural characterization and cytotoxic properties of a 4-O-methylglucuronoxylan from *Castanea sativa*. *Journal of Natural Products* 2007;70:60–6.
- [20] Sartori J, Potthast A, Rosenau T, Hofinger A, Sixta H, Kosma P. Alkaline degradation of model compound related to beech xylan. *Holzforschung* 2004;58:588–96.
- [21] Sixta H, Potthast A, Krottschek AW. Chemical Pulping Processes. In: Wiley-VCH, editor. *Handbook of Pulp*. H. Sixta, 2008.
- [22] Hartler N, Svensson I-L. ALKALI STABILITY OF SOME URONIC ACIDS AND ITS IMPLICATIONS IN BOROHYDRIDE and POLYSULFIDE COOKING. *I&EC* 1965;4:80–2.
- [23] Clayton DW. The alkaline degradation of some hardwood 4-O-methyl-D-glucuronoxylans. *Svensk Papperstidning* 1963;66:115–24.
- [24] Teleman a, Hausalo T, Tenkanen M, Vuorinen T. Identification of the acidic degradation products of hexenuronic acid and characterisation of hexenuronic acid-substituted xylooligosaccharides by NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research* 1996;280:197–208.
- [25] Fanta GF, Abbott TP, Herman AI. Hydrolysis of wheat straw hemicellulose with trifluoroacetic acid. Fermentation of xylose with *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnology and Bioengineering* 1984;26:1122–5.

- [26] Matsumoto S, Ikeda Y, Suzuki H, Ogai M, Miyoshi N. NO_x storage-reduction catalyst for automotive exhaust with improved tolerance against sulfur poisoning. *Applied Catalysis B: Environmental* 2000;25:115–24.

Annexe du chapitre II

Étude de la reproductibilité pour la production de XOS

Il a été montré dans le chapitre II que la production de XOS à partir de MGX de hêtre (lot 2) était répétable. Au regard, de la variabilité des xylanes natifs (voir chapitre I-B), la reproductibilité de l'hydrolyse contrôlée en milieu acide dilué sur différents lots de xylanes a été étudiée.

I. Expériences et analyses réalisées

Six lots de xylanes de différentes origines ont été hydrolysés à 50 g/L dans 0,7 M d'acide sulfurique à 90°C pendant 45 minutes. Certains de ces lots ont été testés deux fois : sur 500 mg de xylanes natifs et sur 2 g de xylanes ultrafiltrés. L'hydrolyse sur le lot 2 a été refaite spécialement pour l'étude de la reproductibilité. Les expériences réalisées ainsi que les rendements d'hydrolyse après purification sont résumés dans le Tableau 4. Les 9 différents lots de XOS obtenus ont été soumis à une analyse RMN du proton dans l'eau deutérée, une analyse SEC-RI et une analyse MALDI-TOF.

Tableau 4. Expériences réalisées pour l'étude de la reproductibilité de la production d'oligomères de xylane

n°	Lot	Essence	Masse hydrolysée (g)	Rendement (%)
1	1	Hêtre	0,5	24
2	2		0,5	20
3			2	22
4	4		0,5	21
5			2	22
6	6		0,5	19
7			2	38
8	7	Bouleau	0,5	19
9	8		0,5	16

II. Résultats

Les analyses RMN du proton permettent de vérifier et de confirmer la structure des XOS, *i.e.* unités xylose liées entre elles en β -1,4 avec la présence de substituants MeGlcA. L'intégration des signaux permet d'obtenir la proportion moyenne des MeGlcA (Tableau 5). Il en ressort que pour tous les lots, il y a en moyenne un MeGlcA pour 2 unités xylose. Le Tableau 5 résume également les résultats obtenus par SEC à détection RI (calibrage pullulane). Les profils SEC sont tout à fait similaires entre eux, avec des masses molaires comprises entre 1000 et 2000 g/mol.

Néanmoins, les analyses des essais 4, 6 et 7 révèlent la présence d'agrégats résiduels lors de ces essais. La présence d'agrégats semble n'être liée ni au lot de MGX hydrolysé ni à la quantité de MGX initialement introduite. Il est alors probable que la présence d'agrégats résiduels en fin de réaction soit liée à la qualité d'agitation, qui doit être assez forte pour bien homogénéiser le milieu. L'agitation est donc un paramètre clé qu'il faudra contrôler lors d'un scale-up.

Tableau 5. Récapitulatif des résultats obtenus par analyses RMN ^1H et SEC à détection RI des XOS

n°	Grammage	Nombre d'unités xylose par MeGlcA	Agrégats résiduels	\overline{M}_w (g/mol)	\overline{D}
1	500 mg	1,7	non	1400	1,19
2	500 mg	2,0	non	1100	1,16
3	2 g	2,0	non	1600	1,18
4	500 mg	2,4	oui	1100	1,19
5	2 g	2,3	non	1400	1,23
6	500 mg	2,1	oui	1200	1,19
7	2 g	2,3	oui	2200	1,28
8	500 mg	1,8	non	1400	1,20
9	500 mg	1,7	non	1700	1,27

Chaque lot de XOS a finalement été analysé par MALDI-TOF, ce qui a permis de confirmer que chaque essai produit des XOS d'environ 1500 g/mol et que la population principale ne possède qu'une unique unité MeGlcA par chaîne (Tableau 6).

Tableau 6. Récapitulatif des résultats obtenus par analyse MALDI-TOF des XOS

n°	Grammage	% de la pop. principale à 1 MeGlcA par chaîne	\overline{M}_w (g/mol)	Φ
1	500 mg	55	1900	1,22
2	500 mg	62	1200	1,14
3	2 g	60	1300	1,16
4	500 mg	56	1800	1,23
5	2 g	54	1600	1,20
6	500 mg	54	1900	1,23
7	2 g	45	1900	1,21
8	500 mg	53	1900	1,21
9	500 mg	73	1300	1,21

En conclusion, quel que soit le lot de MGX de départ utilisé, la méthodologie mise au point permet d'obtenir des XOS de composition et structure très similaires avec une masse molaire comprise entre 1000 et 2000 g/mol et en majorité une seule ramification MeGlcA par chaîne. Le tout avec des rendements compris entre 16% et 38%.

Chapitre III

Synthèse de dérivés fonctionnels du xylane



Les propriétés en solution des xylanes ainsi que leurs propriétés nutritionnelles suscitent un intérêt grandissant au sein des secteurs cosmétiques, agro-alimentaires et pharmaceutiques. Les deux groupements hydroxyle réactifs sur le motif de répétition de la chaîne principale du xylane, la diversité des groupements osidiques sur ses chaînes latérales ainsi que l'extrémité réductrice offrent de nombreuses possibilités pour des modifications chimiques sélectives. La fonctionnalisation des xylanes ouvre ainsi de nouvelles pistes à la création de matériaux inédits. La fonctionnalisation chimique des MGX et des XOS, nécessaire à la synthèse de nouveaux polymères par 'chimie click', sera étudiée dans ce chapitre. Une première partie est consacrée à l'oxydation par le periodate de sodium à la fois des MGX et de leurs oligomères, permettant ainsi d'amener de nouvelles fonctions aldéhyde tout en ouvrant des unités xylose. La deuxième partie traite de l'amination réductrice des fonctions aldéhyde afin de fonctionnaliser les xylanes soit par un groupement allyle, soit par un groupement azoture.

Sommaire

Partie A.	137
Oxydation au periodate de sodium.	137
I. Etude préliminaire	137
I.1. Méthodes de suivi de réaction	138
I.2. Détermination du degré d'oxydation	139
II. Etude de l'oxydation des xylanes filtrés	139
II.1. Influence du taux de periodate	140
II.2. Effet de la température	143
II.3. Effet de la concentration en xylane	145
II.4. Reproductibilité	147
III. Etude de l'oxydation des xylo-oligosaccharides	148
Partie B.	151
Amination réductrice	151
I. Amination réductrice des xylanes oxydés	151
II. Amination des oligomères de xylanes	153
II.1. Oligomères oxydés	153
II.2. Fonctionnalisation par l'extrémité réductrice des oligomères non-oxydés	154
Conclusion	159
Références	160

Partie A.

Oxydation au periodate de sodium

Les groupements hydroxyle des xylanes peuvent être le lieu de nombreuses réactions typiques de la chimie organique : alkylation, oxydation, sulfatation, *etc.* développées dans l'étude bibliographique. Parmi ces réactions, l'oxydation au periodate de sodium possède les avantages d'être hautement sélective et de pouvoir être menée dans l'eau à température ambiante. L'ion periodate oxyde spécifiquement les groupements hydroxyle des carbones contigus 2 et 3 de l'unité répétitive du xylane, générant ainsi deux groupements aldéhyde. La liaison entre les carbones 2 et 3 est rompue, il y a ouverture du cycle pyranosique et libération d'un ion iodate (IO_3^-) entraînant une augmentation de la flexibilité de la chaîne (Figure 1).

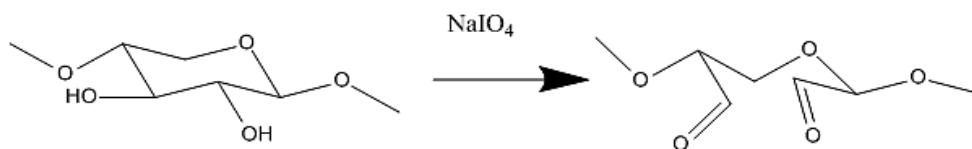


Figure 1. Équation-bilan de l'oxydation du xylane par le periodate de sodium

Cette partie présente l'étude de l'influence de divers paramètres réactionnels lors de l'oxydation de xylanes de hêtre par le periodate de sodium afin de pouvoir contrôler la réaction. Dans un premier temps, l'influence du taux de periodate est discutée. Puis les effets de la température et de la concentration du milieu sont étudiés par le suivi cinétique de la réaction et la caractérisation en SEC du produit obtenu. L'oxydation sur les lots de xylanes 4 et 6 a été étudiée pour démontrer la reproductibilité des résultats obtenus. L'oxydation des XOS décrits dans le chapitre II a également été entreprise.

I. Etude préliminaire

Cette étude préliminaire discute des différentes méthodes pour réaliser le suivi cinétique de la réaction et décrit la méthode employée pour déterminer le degré d'oxydation du produit. Toute l'étude préliminaire a été réalisée sur le lot 4 de MGX.

I.1. Méthodes de suivi de réaction

Le suivi de la consommation du periodate de sodium au cours de l'oxydation renseigne directement sur l'avancée de la réaction. Deux méthodes de suivi ont été mises en place et comparées : le suivi par titrage iodométrique, et le suivi spectrométrique (méthodes exposées en partie expérimentale de ce chapitre). Ces deux méthodes sont largement utilisées et décrites dans la littérature pour l'oxydation au periodate de tout type de substrats [1,2]. La méthode de suivi iodométrique est basée sur le titrage colorimétrique des ions iodates générés lors de l'oxydation par le thiosulfate de sodium. Pour la seconde méthode, l'absorbance de la solution à 225 nm est mesurée et la quantité de periodate en solution est directement déterminée grâce à la courbe de calibrage mise en place.

Les deux méthodes de suivi ont été comparées sur l'oxydation de MGX ultrafiltrés à 20 mol.% de periodate de sodium. Ce taux correspond au nombre de periodate par unité xylose soit $\frac{n \text{ periodate}}{n \text{ xylose}} \times 100$.

Ces deux méthodes donnent des résultats similaires (Figure 2) mais la méthode spectrométrique est plus précise et plus simple à mettre en place que la méthode iodométrique. De ce fait, le suivi spectrométrique a été choisi et systématiquement employé au cours du reste de l'étude.

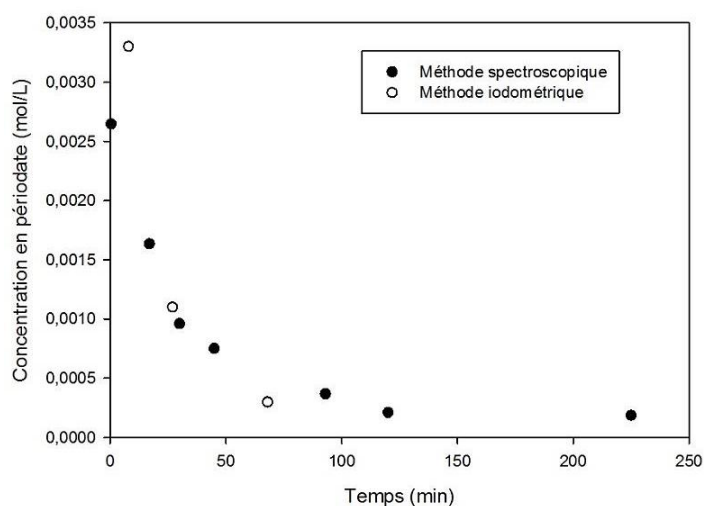


Figure 2. Comparaison de deux méthodes de suivi de la consommation du periodate de sodium lors de l'oxydation

I.2. Détermination du degré d'oxydation

Le degré d'oxydation est déterminé par dosage des fonctions aldéhyde produites. L'une des méthodes décrite dans la littérature comme fiable et efficace pour le dosage des fonctions aldéhyde est celle par addition de chlorhydrate d'hydroxylamine [3,4]. Lors de cette réaction, une fonction aldéhyde réagit avec une fonction amine libérant ainsi de l'acide chlorhydrique dosé ensuite par la soude (Figure 3).

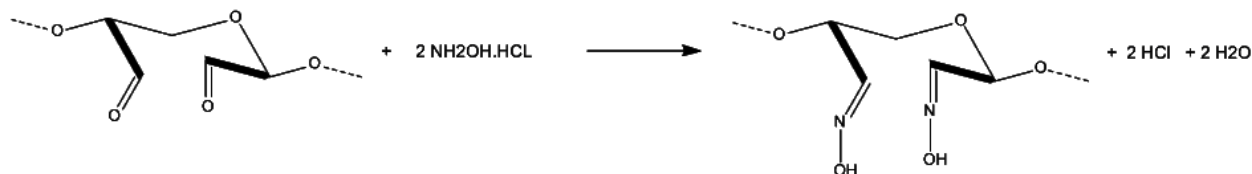


Figure 3. Réaction du chlorhydrate d'hydroxylamine avec les xylanes oxydés

Un équivalent d'acide est libéré pour un équivalent d'aldéhyde ayant réagi, or il y a deux aldéhydes par unité 'xylose' donc le degré d'oxydation sera égal à

$$DO = \frac{V_{eq} * [NaOH] - 2 * \frac{m \text{ introduite}}{DP (M \text{ xylose} + (\frac{1}{x}) M \text{ acide glucuronique})}}{2 * \frac{m \text{ introduite}}{M \text{ xylose} + (\frac{1}{x}) M \text{ acide glucuronique}}}$$

où x est le nombre d'unités xylose pour une unité MeGlcA.

Notons qu'au nombre total d'aldéhyde déterminé par le titrage, il est soustrait le nombre d'aldéhyde de l'extrémité réductrice.

II. Etude de l'oxydation des xylanes filtrés

L'agrégation des xylanes en milieu aqueux doit avoir un effet sur l'oxydation. Afin de s'affranchir de cet effet, les oxydations ont été réalisées sur des xylanes ultrafiltrés (membrane 300 kDa). Après ultrafiltration, la masse molaire des xylanes du lot 4 a été évaluée à 18 000 g/mol (SEC-MALLS) et le nombre d'unités xylose pour un MeGlcA à 10 (RMN ¹H). Le lot 4 ultrafiltré a donc un \overline{DP}_n de l'ordre de 120.

L'influence de différents paramètres – taux de periodate, température de réaction et concentration en xylanes – sur l'oxydation au periodate a été étudiée. Une étude de reproductibilité sur le lot 6 a été ensuite entreprise. De la même manière, le lot 6 a été

préalablement ultrafiltré. Avec une masse molaire estimée à 8100 g/mol (SEC-MALLS) et 8 unités xyloses pour un MeGlcA, le lot 6 ultrafiltré a un \overline{DP}_n de l'ordre de 50.

II.1. Influence du taux de periodate

La quantité de periodate introduite dans le milieu réactionnel conditionne directement le degré d'oxydation du xylane modifié. Trois différents ratios de periodate par unité répétitive ont été étudiés, *i.e.* 5, 20 et 100 mol.%. Les réactions d'oxydation ont été réalisées à 10 g/L en xylanes et à 25°C. La cinétique de consommation du periodate a été estimée pendant les 8 heures de réaction par suivi de l'absorbance à 225 nm. Chaque réaction a été répétée deux fois et une bonne répétabilité des résultats a été obtenue [2].

Comme le montre la Figure 4, quel que soit le taux de periodate considéré, la concentration en periodate n'atteint jamais une valeur nulle. Un plateau est systématiquement observé, ce qui indique que le periodate de sodium n'est pas entièrement consommé. Comme décrit par Gomez *et al.* (2007), ce phénomène peut s'expliquer par la formation d'hémiacétals inter- et intra-moléculaires qui protègent les groupements -OH de l'attaque par NaIO_4 [1].

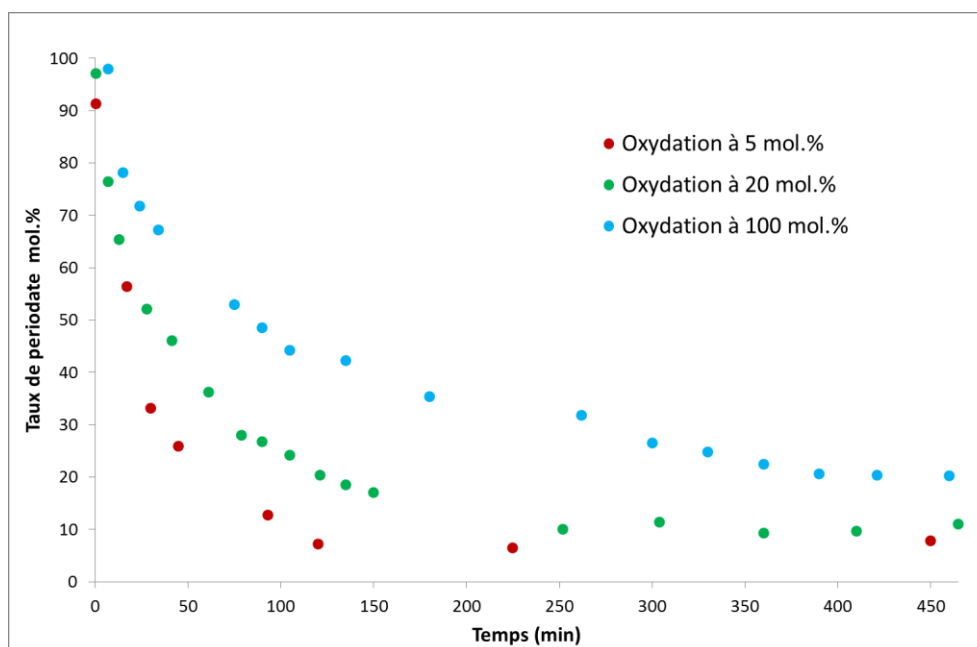


Figure 4. Étude de l'influence du taux de periodate sur la cinétique de consommation du periodate lors de l'oxydation du xylane

À un ratio en periodate de 5 mol.%, la concentration atteint une valeur constante après 120 minutes de réaction et 92% du periodate est alors consommé. La concentration finale en periodate, alors consommé à 90%, est atteinte après 220 minutes pour un ratio de 20 mol.% ; et après 390 minutes à 100 mol.%, 80% du periodate est alors consommé. Lorsque le taux de periodate augmente, davantage de fonctions aldéhyde sont générées et donc davantage d'hémiacétals. Les -OH libres étant protégés par la formation des hémiacétals, l'oxydation des groupements hydroxyle est de ce fait plus difficile pour des ratios NaIO_4 / xylose élevés.

Comme le montre la Figure 5, la masse molaire du xylane oxydé à 5 mol.% en periodate (en rouge) est identique à celle du xylane de départ (en noir).

Pour le xylane oxydé à 20 mol.% en periodate (en vert), un léger décalage du signal est observé. Ce décalage peut s'expliquer par une variation du volume hydrodynamique des chaînes polymères après oxydation. En effet, l'ouverture des cycles et la création des fonctions aldéhyde vont modifier le comportement des xyloses en solution. Kristiansen *et al.* (2010) ont notamment montré, dans le cas de l'oxydation d'alginate, une augmentation non négligeable de la longueur de persistance du polymère qui est donc beaucoup plus flexible : les chaînes adoptent alors des structures plus compactes, plus difficiles à solubiliser [5]. Ceci est d'autant plus vrai que le degré d'oxydation augmente. Néanmoins, une coupure des chaînes de xylane ne peut être exclue [1,6].

Comme attendu, une dépolymérisation complète est constatée dans le cas du xylane oxydé à 100 mol.% en periodate (en bleu). Dans ces conditions d'oxydation, la masse molaire des produits de réaction est proche de celle du xylose.

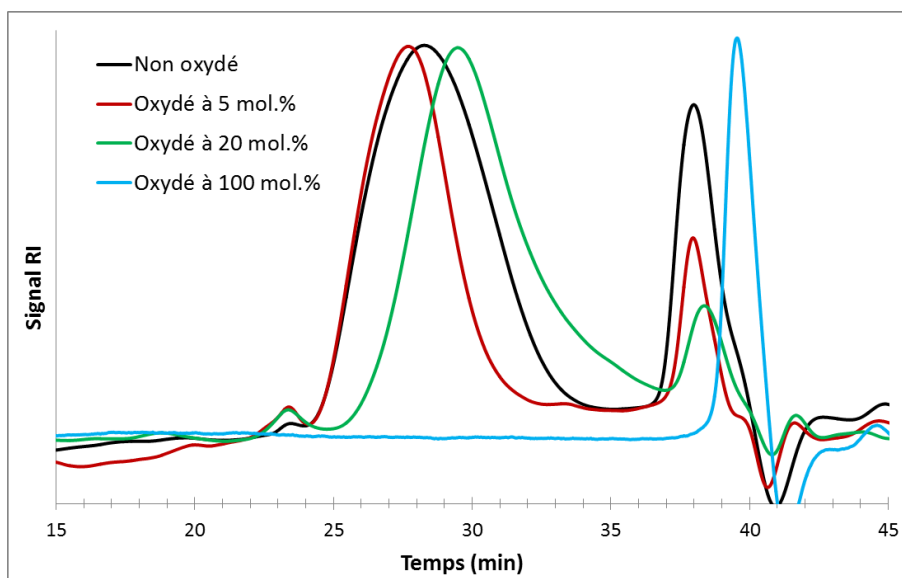


Figure 5. Chromatogrammes obtenus par SEC-RI montrant l'influence du taux de periodate utilisé pour l'oxydation sur la masse molaire des xyloxydes

Les degrés d'oxydation ont été mesurés, par titrage à l'hydroxylamine [3], pour les oxydations à 5 et 20 mol.% de periodate seulement. Pour le taux de periodate de 20 mol.%, le dosage de l'acide chlorhydrique par la soude a été réalisé sur deux échantillons (Figure 6).

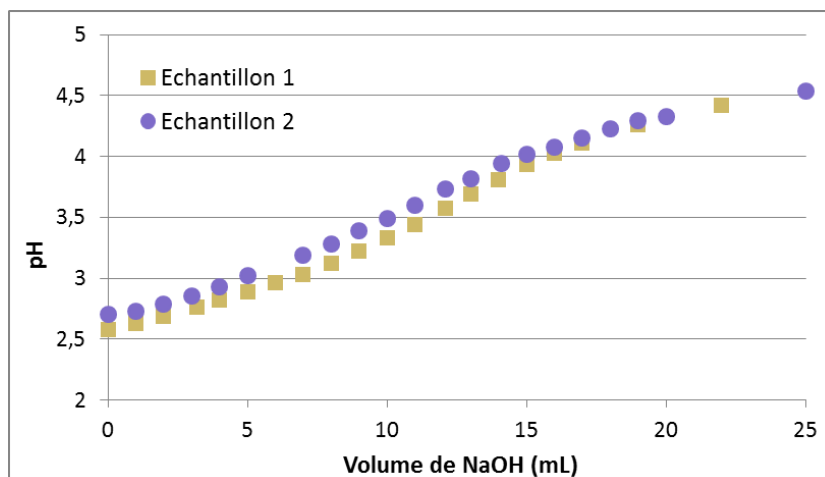


Figure 6. Dosage pH métrique des xyloxydes oxydés à 20 mol.%

Les calculs des dérivées première et seconde permettent d'estimer le volume équivalent égal à 11,5 mL dans un cas et à 12,5 mL dans l'autre. La formule énoncée en I.1.2. permet alors de calculer le degré d'oxydation (**DO**) égal à DO_{titrage} de 16 ± 1 %. Le $DO_{\text{théorique}}$ est fixé à 20% et le $DO_{\text{spectrométrique}}$ est égal à 18% (90% du periodate a été consommé), le titrage semble donc donner une valeur correcte du degré d'oxydation.

Le dosage a également été réalisé sur le xylane oxydé à 5 mol.% de periodate de sodium. Néanmoins, les résultats obtenus sont aberrants (DO négatif). En effet, la quantité d'aldéhyde formée par l'oxydation est trop faible et très peu d'HCl sont ensuite libérés lors de la réaction avec l'hydroxylamine : le titrage devient trop approximatif.

Cette méthode n'est donc pas adaptée pour doser les fonctions aldéhyde créées lors d'oxydations à faibles taux de periodate. Tous les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau 1.

Tableau 1. Récapitulatif des résultats pour l'oxydation des xylanes lot 4

DO théorique	Periodate consommé (%)	Durée pour atteindre le palier	Dé- polymérisation	DO absorbance	DO titrage
5%	92	120	non	5 %	x ^a
20%	90	220	non exclu	18%	16%
100%	80	390	totale	80%	x ^b

^a taux d'aldéhyde trop faible pour être dosé

^b produit dégradé suite à une oxydation trop forte

En fixant le taux de periodate initial à 20 mol.%, les xylanes sont fonctionnalisés à un DO d'environ 16%. Il semble possible de contrôler le DO en fixant le taux de periodate de sodium de départ à condition de ne pas dépolymériser. En fonction du degré de substitution et de la post-modification, il existe donc un grand nombre de possibilités pour modifier ces xylanes et ainsi leur amener une forte valeur ajoutée.

II.2. Effet de la température

Afin de diminuer le temps de réaction tout en gardant le contrôle de l'oxydation, l'effet de la température a été étudié. Quatre températures de réaction ont été comparées : 25°C, 40°C, 60°C, et 80°C. La consommation du periodate de sodium a été suivie comme évoqué précédemment, et les produits oxydés ont systématiquement été analysés par SEC-RI afin d'observer une éventuelle variation de masse molaire.

Pour la réaction de référence, (taux de periodate de 20 mol.%, 25°C, xylanes concentrés à 10 g/L) la concentration en periodate atteint une valeur constante au bout de 220 minutes. À 40°C, la réaction n'évolue plus après 90 minutes. Le palier est atteint au bout de 30 minutes pour la réaction à 60°C, et 15 minutes pour la réaction à 80°C. Dans tous les cas, environ 90% de la quantité de periodate de sodium initiale est consommée (Figure 7).

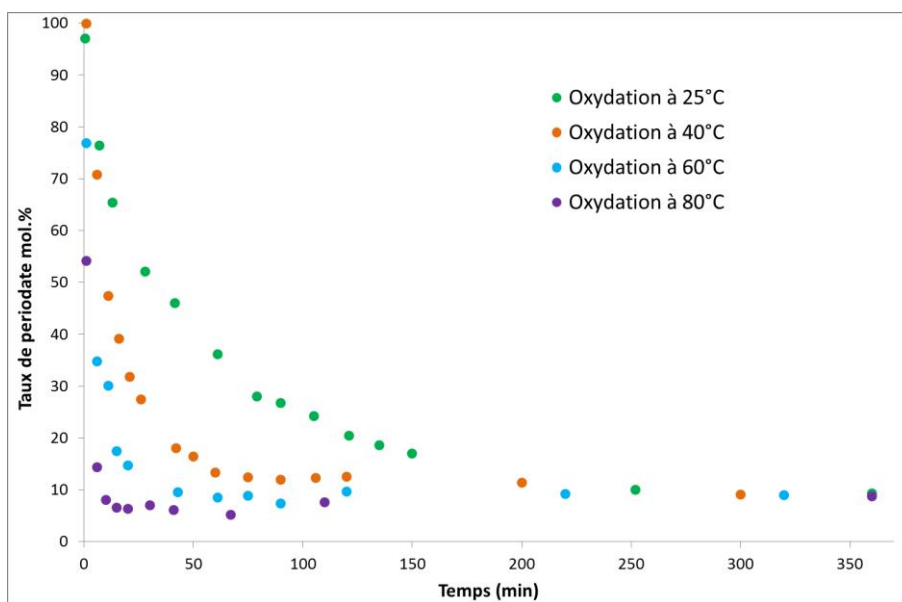


Figure 7. Étude de l'influence de la température sur la cinétique de consommation du periodate lors de l'oxydation du xylane

Comme attendu, une augmentation de la température du milieu réactionnel entraîne une augmentation significative de la cinétique de réaction. Plus surprenant, le palier reste inchangé, à 90% de periodate consommé. Il est donc possible de diminuer la durée de la réaction tout en gardant le même contrôle du degré d'oxydation.

La question en suspend reste la dégradation possible du polymère à plus haute température. Comme le montre la Figure 8, les masses molaires des xylanes oxydés sont similaires pour les quatre températures étudiées, il n'y a donc pas de dégradation du xylane jusqu'à 80°C.

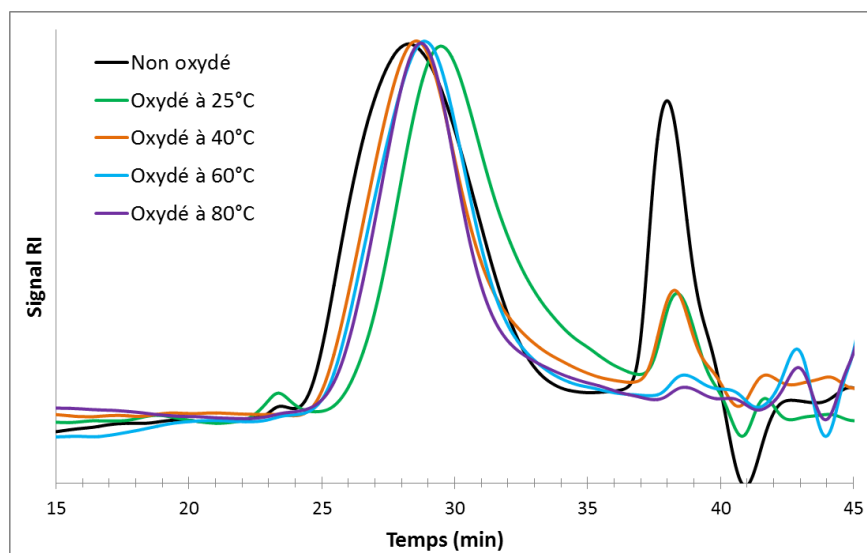


Figure 8. Chromatogrammes SEC-RI montrant l'influence de la température sur la masse molaire des xylanes lors de leur oxydation à 20 mol.% en periodate

II.3. Effet de la concentration en xylane

Dans l'idée d'un scale-up, il serait intéressant de pouvoir travailler à de plus fortes concentrations en xylanes, trois concentrations ont donc été comparées : 10, 50, et 100 g/L. Les essais sont réalisés à 25°C avec un taux de periodate de sodium égal à 20 mol.%. La concentration finale en periodate est atteinte en 220 minutes à 10 g/L, en 60 minutes à 50 g/L et en 30 minutes à 100 g/L (Figure 9).

Pour les deux concentrations les plus élevées, la quantité de periodate de sodium consommé atteint 96% de la quantité initiale alors qu'aucune des réactions précédentes n'a dépassé les 90% pour le même taux de periodate. L'augmentation de la concentration en periodate permet donc également d'augmenter la cinétique de consommation du periodate de sodium. Néanmoins, à 100 g/L, la solution de xylane est très visqueuse et les manipulations sont plus délicates.

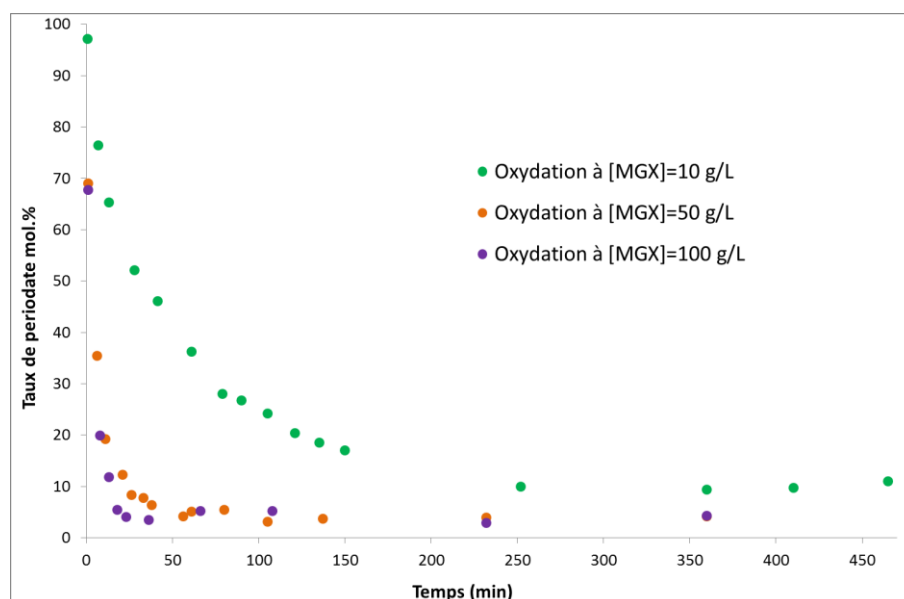


Figure 9. Étude de l'influence de la concentration en xylane sur la cinétique de consommation du periodate lors de l'oxydation du xylane à 20 mol. %

Comme le montrent les analyses SEC-RI (Figure 10), l'augmentation de la concentration en xylane n'induit pas de dégradation de ces derniers. Cependant, la quantité d'une population de forte masse molaire, *a priori* des agrégats, augmente avec la concentration. Il semble que la mise en solution du xylane à forte concentration conduit à la formation d'agrégats du même type que ceux précédemment éliminés par ultrafiltration. Il n'est alors pas certain que la population agrégée soit oxydée.

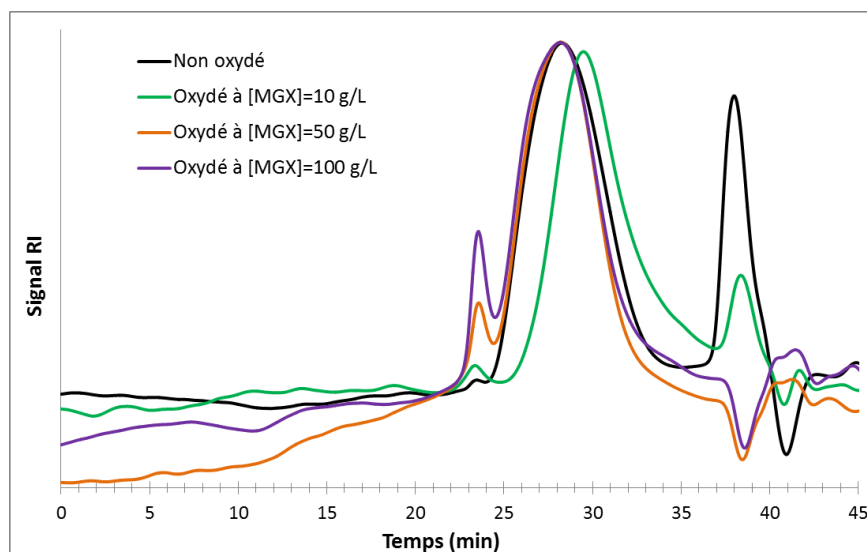


Figure 10. Chromatogrammes obtenus par SEC-RI montrant l'influence de la concentration en xylane sur la masse molaire des xylanes lors de leur oxydation à 20 mol. % en periodate

L'augmentation de la concentration en xylane permet donc d'accélérer la réaction d'oxydation et d'augmenter la quantité totale de periodate consommé. Ce changement de mode opératoire entraîne néanmoins la formation d'agréats. Dans l'idée d'un scale-up, il faudra être très attentif à l'agitation du milieu qui devra être forte et homogène.

II.4. Reproductibilité

L'oxydation du lot 6 à des taux de periodate de 5 et 20 mol.% a été réalisée dans le but d'évaluer la reproductibilité des résultats (10 g/L en xylanes à 25°C). Les analyses d'un seul essai pour chaque taux sont présentées mais les triplicats réalisés donnent des résultats similaires. Le rendement massique des oxydations est compris entre 55 et 60% pour un taux de periodate de 20 mol.%, et entre 50 et 55% pour un taux de 5 mol.%.

Tout comme pour les oxydations du lot 4, le periodate de sodium n'est pas totalement consommé pendant celles du lot 6. Le suivi de la réaction (Figure 11) montre qu'à 5 mol.%, 91% du periodate est consommé et qu'à 20 mol.%, 88% est consommé. Le palier est néanmoins plus vite atteint dans le cas du lot 6. Il est atteint après 160 min de réaction à 20 mol.% de periodate (220 min pour le lot 4) et après 90 min pour 5 mol.% (120 min pour le lot 4). Cette différence de cinétique peut s'expliquer par la différence de longueur des chaînes xylane. Le lot 4 a un \overline{DP}_n de 120 contre 50 pour le lot 6. Une chaîne plus courte s'oxyde plus vite que son homologue de taille supérieure.

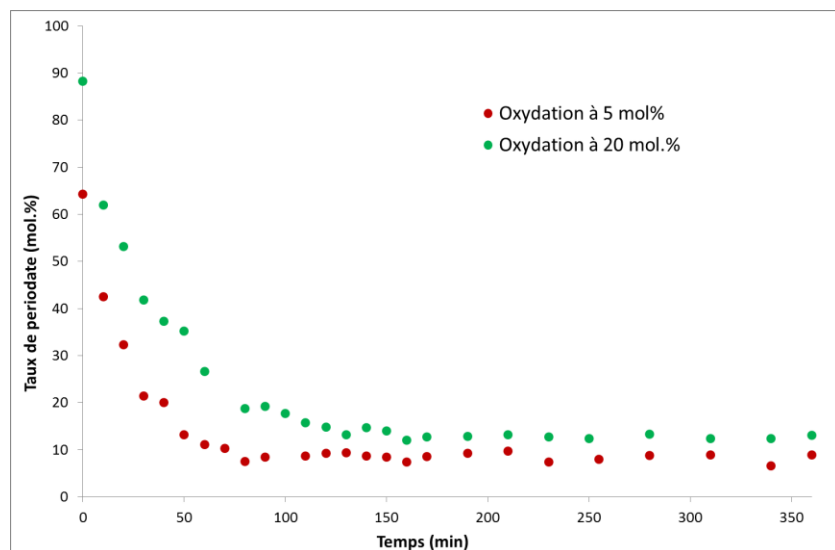


Figure 11. Suivi cinétique de la réaction d'oxydation des xylanes ultrafiltrés à 5 et 20 mol.% en periodate

Le titrage à l'hydroxylamine a été réalisé pour les deux taux de periodate et, comme précédemment, le titrage ne donne aucun résultat probant pour l'oxydation à 5 mol.% de periodate.

Pour le taux de periodate de 20 mol.%, un titrage a été réalisé pour chacune des trois oxydations. Les calculs des dérivées première et seconde permettent d'estimer le volume équivalent à 4,3 mL pour le premier essai, à 5,8 mL pour le second et à 4,8 mL pour le dernier essai. Finalement, le DO_{titrage} est de $12 \pm 2\%$.

Le $DO_{\text{théorique}}$ était fixé à 20% et le $DO_{\text{spectrométrique}}$ est égal à 18% (90% du periodate a été consommé). Cette fois, le titrage donne donc une valeur un peu sous-estimée mais cohérente. Il est possible que la réaction avec l'hydroxylamine ne soit pas totale.

L'ensemble des résultats pour les lots 4 et 6 sont résumés dans le Tableau 2. L'oxydation au periodate de sodium des xylanes est donc reproductible, ce qui est très intéressant pour envisager une phase de scale-up.

Tableau 2. Récapitulatif des résultats pour l'oxydation des xylanes lots 4 et 6

DO théorique	Periodate consommé (%)		Durée pour atteindre le palier		DO absorbance		DO titrage	
	4	6	4	6	4	6	4	6
Lot :	4	6	4	6	4	6	4	6
5%	92	91	120	90	5%	5%	x ^a	x ^a
20%	90	88	220	160	18%	18%	16%	12%

^a taux d'aldéhyde trop faible pour être dosé

III. Etude de l'oxydation des xylo-oligosaccharides

Les oxydations des XOS décrits dans le chapitre II ont été réalisées à des taux en periodate de sodium de 5 et 33 mol.% (10 g/L et à 25°C). Le taux de periodate de sodium restant dans la solution a été suivi au cours du temps par spectrométrie d'absorbance à 225 nm (Figure 12). Les réactions d'oxydation ont été réalisées en triplicat et ont montré une forte répétabilité : un seul suivi cinétique est représenté.

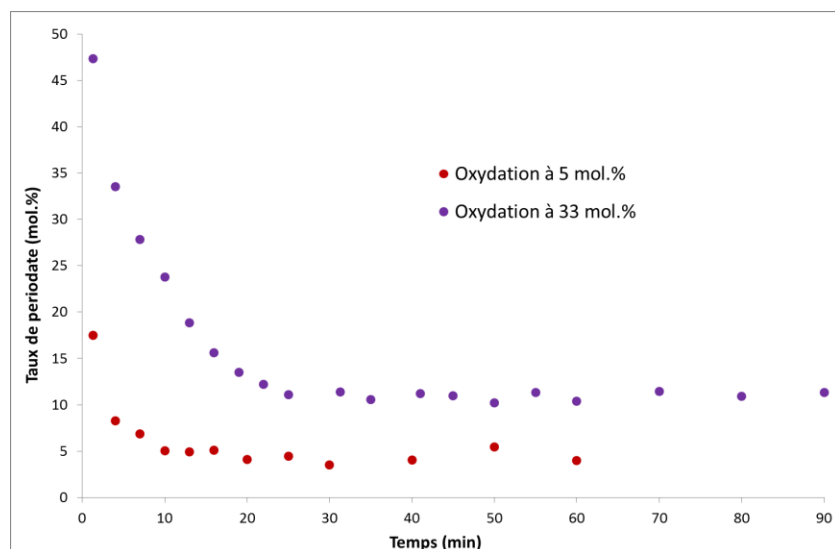


Figure 12. Suivi cinétique de consommation du periodate lors de l'oxydation des oligomères de xylane

Comme dans les cas précédents, la consommation du periodate de sodium n'est pas totale et la quantité consommée est plus importante pour le taux de 5 mol.% (95% du periodate est consommé) que pour le taux de 33 mol.% (90% de periodate est consommé). La réaction est très rapide : le palier est atteint en 15 min pour 5 mol.% et en 25 min pour 33 mol.% en periodate. Cela confirme que la masse molaire des xylanes influe sur la vitesse de la réaction : plus la masse molaire diminue plus la cinétique augmente.

Dans le cas des XOS, les rendements massiques sont compris entre 20 et 30% pour le taux de 33 mol.% et autour de 18% pour le taux de 5 mol.%. Au regard de ces faibles rendements, la procédure employée pour la purification des produits de l'oxydation ne semble que peu adaptée aux oligomères.

Les analyses SEC-RI n'ont pas pu être réalisées. En effet, les oligomères oxydés ne sont plus solubles dans le tampon phosphate utilisé pour la SEC. La formation d'aldéhydes supplémentaires favorise l'agrégation des chaînes de ces XOS dans l'eau. Cette insolubilité tend à montrer qu'il n'y a pas eu de dépolymérisation des XOS mais cela reste néanmoins difficile à prouver.

Le titrage pour l'oxydation à 5 mol.% n'a pas été concluant, et pour le taux de periodate de 33 mol.%, le calcul des dérivées première et seconde permet de estimer le volume équivalent à 14,5 mL, soit un DO_{titrage} de 26%. Le $DO_{\text{théorique}}$ était fixé à 33% et le $DO_{\text{spectrométrique}}$ est égal à 30%

(90% du periodate a été consommé). Le titrage donne donc une valeur du DO très proche de celle attendue. Tous les résultats sur l'oxydation des XOS sont résumés dans le Tableau 3.

Tableau 3. Récapitulatif des résultats pour l'oxydation des oligomères de xylanes

DO théorique	Periodate consommé (%)	Durée en min pour atteindre le palier	Dé-polymérisation	DO absorbance	DO titrage
5%	95	15	non	5%	x ^a
33%	90	30	non	30%	26%

^a taux d'aldéhyde trop faible pour être dosé

Partie B.

Amination réductrice

L'amination réductrice est une réaction bien connue pour transformer l'extrémité réductrice des polysaccharides [7–9]. Cette réaction entre une amine et un aldéhyde permet de fonctionnaliser les xylanes selon la nature du groupement R (Figure 13). Dans notre étude, la benzylamine a été choisie comme molécule modèle pour la fonctionnalisation des produits oxydés car aisément visible en RMN. Puis, l'allylamine et l'azoture d'aminoéthyle ont été utilisés pour fonctionnaliser les XOS, respectivement, par des groupements allyle ou azoture. Le protocole utilisé dans cette thèse a été adapté d'un mode opératoire développé au laboratoire [10].

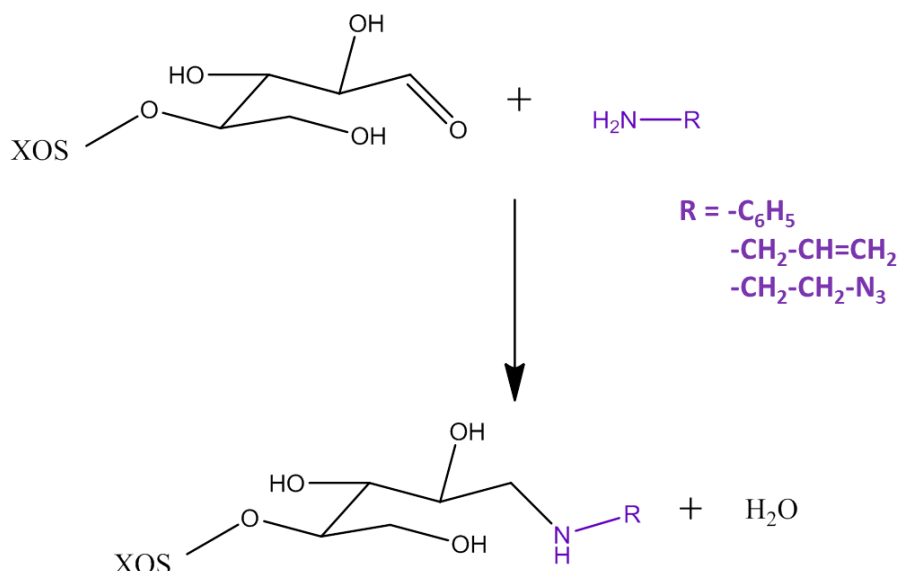


Figure 13. Amination réductrice sur l'extrémité réductrice du xylane

I. Amination réductrice des xylanes oxydés

L'amination des xylanes oxydés présente deux intérêts. Le premier serait de doser par RMN du proton le taux de fonctions aldéhyde, notamment lorsque celui-ci est faible. Le dosage direct des aldéhydes par RMN du proton est impossible à cause de la formation d'hémiacétal inter- et intramoléculaires dans l'eau. Une étude de Kristiansen *et al.* (2009) montre qu'après réduction des aldéhydes par le borohydrure de sodium, le spectre RMN du proton est alors simplifié [11]. En s'inspirant de cette étude, l'amination réductrice a été employée pour venir greffer des

groupements benzyle sur les aldéhydes. Le second intérêt est de placer le long du squelette des xylandes plusieurs fonctions réactives qui pourraient, par de *post-modifications*, conduire à des copolymères en peigne.

Lors de l'amination réductrice d'un produit d'oxydation, plusieurs études s'accordent à dire qu'un seul groupement vient s'ajouter sur les deux fonctions aldéhyde de la même unité selon le mécanisme présenté Figure 14 [12–14].

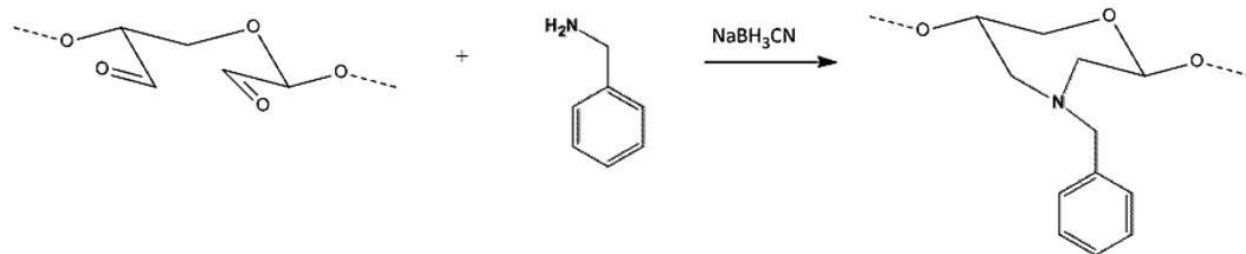


Figure 14. Amination réductrice sur deux fonctions aldéhyde du xylane oxydé [12]

L'amination réductrice des aldéhydes par la benzylamine a été réalisée sur les xylandes oxydés du lot 4 (une seule réaction par taux de periodate à 5 et 20 mol.%). Le spectre RMN du proton du produit benzylé après oxydation à 20 mol.% en periodate est présenté Figure 15.

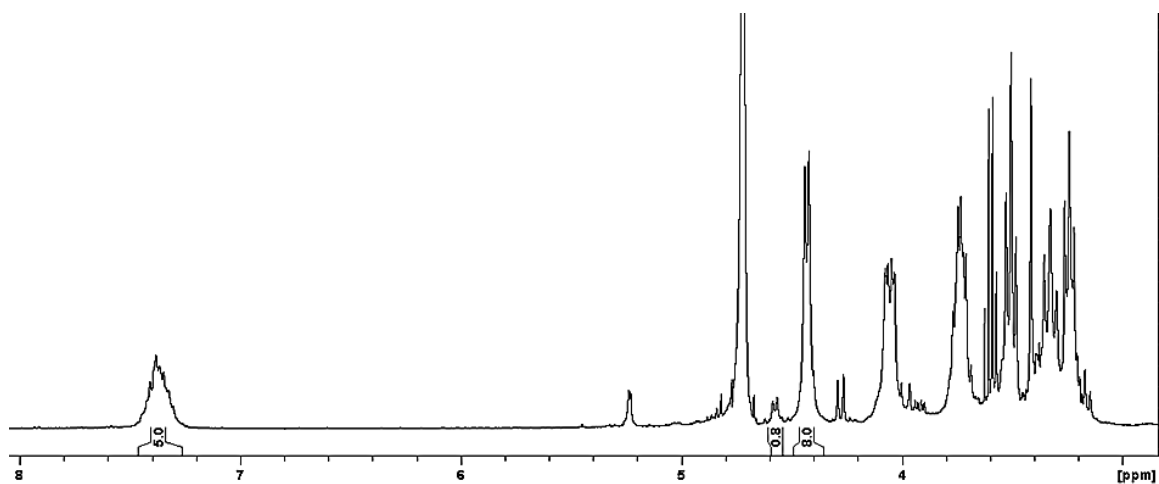


Figure 15. Spectre RMN ^1H du xylane lot 4 benzylé après oxydation à 20 mol.% en periodate (D_2O)

Les signaux de la benzylamine apparaissent très clairement entre 7,2 et 7,5 ppm. Grâce aux intégrations des signaux, le $\text{DO}_{\text{amination}}$ est estimé à 11 %. La valeur obtenue est donc inférieure à celle obtenue par le dosage à l'hydroxylamine (Tableau 4). L'amination n'a probablement pas été totale et la valeur obtenue ne reflète donc que partiellement le degré d'oxydation.

La même analyse a été réalisée pour le taux de periodate de sodium de 5 mol.% et les intégrations des pics permettent de conclure à un $DO_{amination}$ égal à 4 %. L'amination réductrice a bien fonctionné et il est donc possible de doser les faibles taux d'aldéhyde par cette méthode, bien que la valeur obtenue soit légèrement inférieure à celle attendue (Tableau 4).

Tableau 4. Récapitulatif des résultats pour l'oxydation des xylanes du lot 4, complété par l'amination

DO théorique	Periodate consommé (%)	Durée pour atteindre le palier	DO absorbance	DO titrage	DO amination
5%	92	120	5%	x ^a	4%
20%	90	220	18%	16%	11%

^a taux d'aldéhyde trop faible pour être dosé

L'amination réductrice semble donc pouvoir être utilisée pour doser efficacement les fonctions aldéhyde même à faible pourcentage d'oxydation. Néanmoins, cette méthode sous-estime légèrement le nombre d'aldéhyde et donc le degré d'oxydation. Elle est longue et demande plus d'équipements qu'un simple titrage acido-basique.

L'amination réductrice est surtout une réaction simple, réalisée en phase aqueuse, qui permet de venir greffer de nombreux groupements R le long du squelette des xylanes. Le contrôle de la première étape, *i.e.* l'oxydation au periodate de sodium, à l'avantage de permettre une *post*-fonctionnalisation à un DS contrôlé. Il est raisonnable de penser que, quelle que soit le groupement introduit, les DS atteints seraient alors très similaires à ceux obtenus avec la benzylamine. Par manque de temps, l'amination réductrice des xylanes oxydés n'a pas pu être testée ni avec l'azoture d'aminoéthyle ni avec l'allylamine.

II. Amination des oligomères de xylanes

II.1. Oligomères oxydés

Pour les mêmes raisons que précédemment, l'amination avec la benzylamine a été réalisée sur les XOS oxydés à 5 et 33 mol.%. Pour le produit oxydé à 5 mol.%, la RMN dans D₂O est impossible car le produit obtenu est insoluble. La solubilité de ce composé a alors été testée

dans le DMSO deutéré. Malheureusement, la solution obtenue est trop turbide pour être analysée en RMN. Pour le produit oxydé à 33 mol.%, l'intégration des signaux de l'analyse RMN donne un $DO_{\text{amination}}$ de 27 %. La valeur obtenue est donc quasiment égale à celle obtenue par le suivi spectrométrique lors de la phase d'oxydation (Tableau 5). Là encore, l'amination réductrice semble efficace pour le dosage des fonctions aldéhyde.

Tableau 5. Récapitulatif des résultats complétés par l'amination pour l'oxydation des oligomères de xylnes

DO théorique	Periodate consommé (%)	Durée en min pour atteindre le palier	DO absorbance	DO titrage	DO amination
5%	95	15	5%	x ^a	x ^b
33%	90	30	30%	26%	27%

^a taux d'aldéhyde trop faible pour être dosé

^b produit obtenu insoluble dans D₂O et DMSO deutéré

II.2. Fonctionnalisation par l'extrémité réductrice des oligomères non-oxydés

La fonctionnalisation des XOS non-oxydés par leur extrémité réductrice a été envisagée pour élaborer de nouvelles structures de type copolymères à blocs, par réaction de couplage de type 'click'. L'azoture d'aminoéthyle et l'allylamine ont donc été utilisés comme agents de fonctionnalisation (Figure 16). En effet, une fonction azoture permettra d'envisager un couplage par cyclo-addition de Huisgen et une fonction allyle, un couplage par thiol-ène.

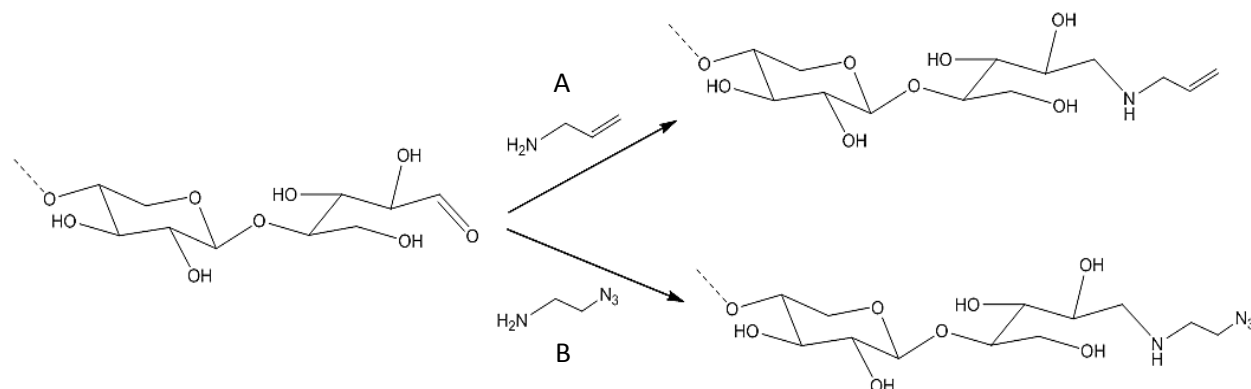


Figure 16. Fonctionnalisation de l'extrémité réductrice des oligomères soit par l'allylamine (A), soit par l'azoture d'aminoéthyle (B)

Les produits de l'amination ont tout d'abord été analysés par spectroscopie IRTF (pastille KBr) et les spectres sont représentés Figure 17. Le spectre des XOS fonctionnalisés avec l'allylamine (A) ne montre aucune différence avec le spectre des XOS avant réaction (O). Il est fort probable que les vibrations de la double liaison terminale ne soit pas visible même si elle est présente. Néanmoins, dans le cas des XOS fonctionnalisés avec l'azoture d'aminoéthyle (B), il est aisé de voir l'apparition d'un signal correspondant à l'azoture à environ 2100 cm^{-1} .

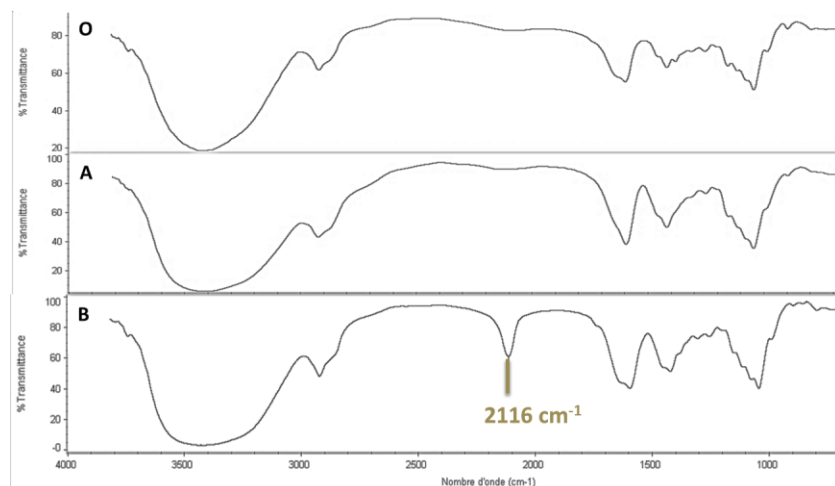


Figure 17. Spectres IRTF des oligomères (O) et des oligomères fonctionnalisés soit par l'allylamine (A), soit par l'azoture d'aminoéthyle (B)

Pour compléter ces analyses, les XOS fonctionnalisés ont été analysés par RMN (Figure 18). Les spectres RMN révèlent, quant à eux, l'apparition de nouveaux signaux dans les deux cas.

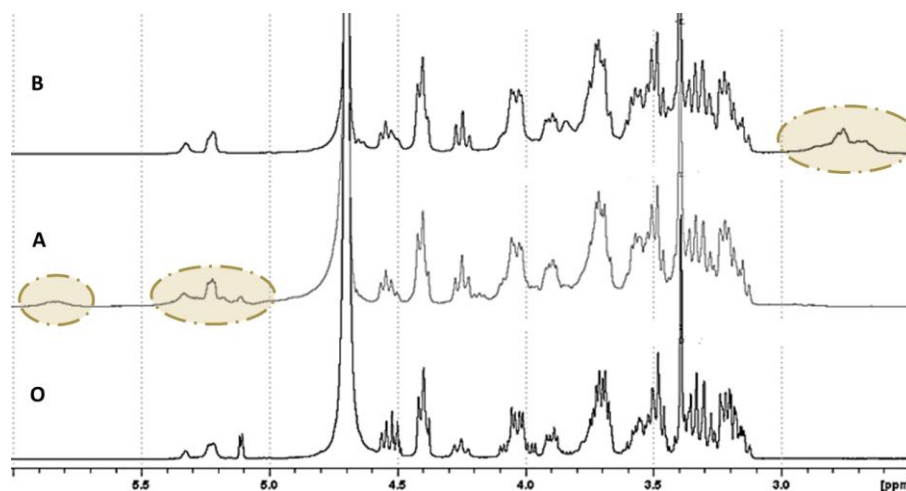


Figure 18. Spectres RMN ^1H des oligomères (O) et des oligomères fonctionnalisés soit par l'allylamine (A), soit par l'azoture d'aminoéthyle (B)

Sur le spectre de la Figure 18-A, les nouveaux signaux à 5,10-5,45 ppm (2H, =CH₂) et 5,75-5,95 ppm (1H, -CH=) ppm correspondent à la fonction allyle. Sur la Figure 18-B, les signaux à 2,55-3,00 ppm (4H, -CH₂-CH₂-) correspondent à l'éthylazide. Les analyses en RMN du proton permettent donc de voir, sans ambiguïté, la présence des groupements fonctionnels dans les produits d'amination.

Finalement, le lien chimique entre le XOS et ces groupements fonctionnels a été confirmé par des analyses RMN DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy) en deux dimensions qui permettent d'obtenir le spectre proton en fonction du coefficient de diffusion de la molécule [15,16] (Figure 19). Les analyses en DOSY sont particulièrement adaptées lorsque les masses molaires des deux espèces à comparer sont éloignées car les deux coefficients de diffusion sont en général bien distincts.

L'analyse des produits d'amination a ainsi été réalisée (A et B à gauche de la Figure 19), et un seul coefficient de diffusion est observé, ce qui est en faveur de la présence d'une seule espèce : les XOS portant en leur extrémité les groupements fonctionnels. Afin de s'en assurer, l'analyse du même produit d'oxydation mais avec un ajout volontaire d'amine libre en excès, montre nettement l'apparition d'un second coefficient de diffusion (A' et B' à droite de la Figure 19). Ces analyses DOSY prouvent alors sans ambiguïté que la fonctionnalisation des XOS est un succès.

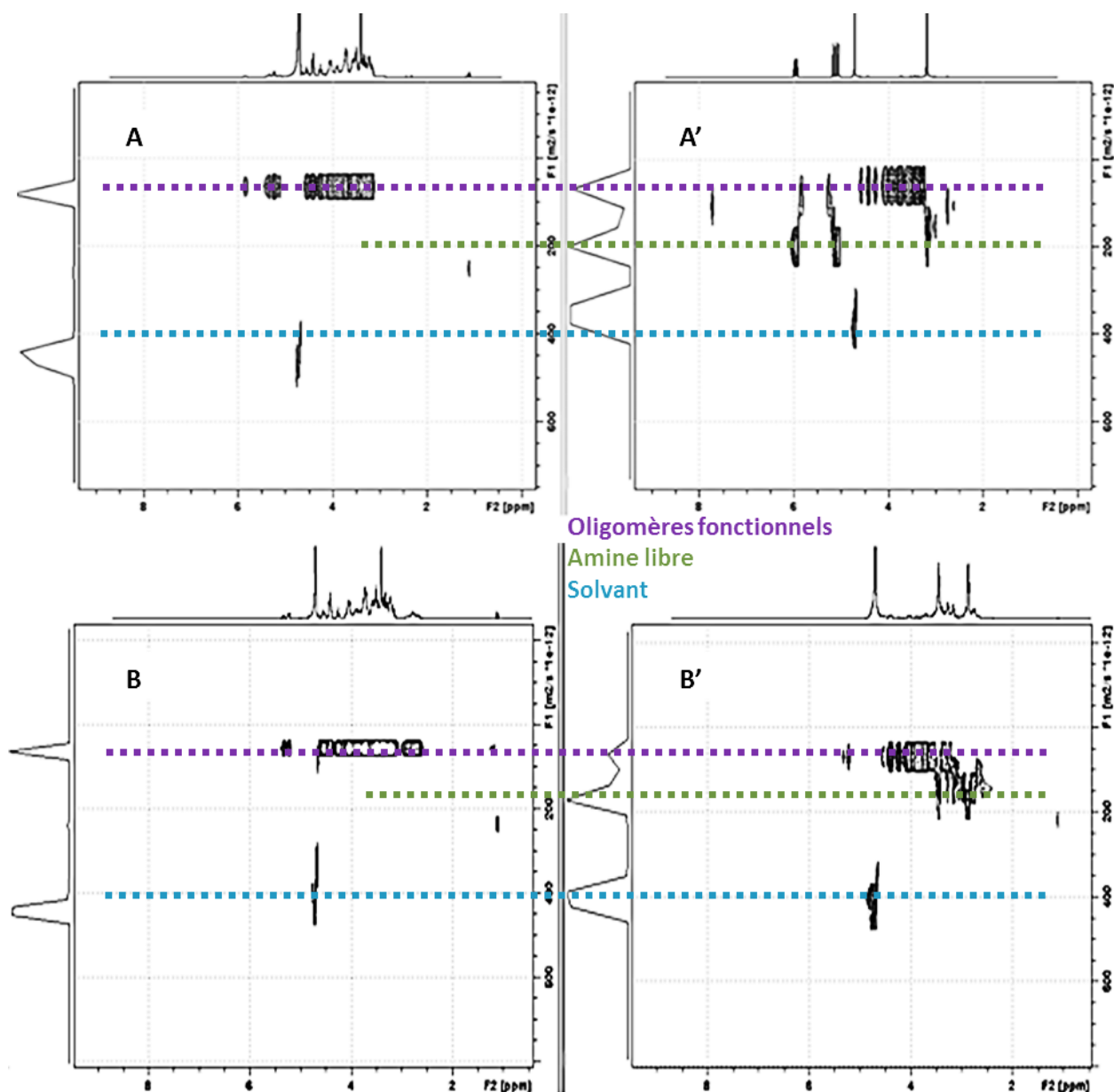


Figure 19. Spectres RMN DOSY des oligomères fonctionnalisés soit par l'allylamine (A), soit par l'azoture d'aminoéthyle (B) avec en A' et B' les mêmes oligomères mais avec une goutte d'amine libre en solution (solvant D_2O)

Cette fonctionnalisation des XOS par un groupement allyle ou azoture, ouvre la voie à la conception de nouveaux copolymères à blocs totalement bio-sourcés et de structure définie et permet d'envisager de nouvelles valorisations des xylanes. À ce stade de la synthèse des composés à bloc XOS, de nombreux blocs à fonction antagoniste sont envisageables pour les coupler aux XOS. Suivant la nature de ce bloc, sa taille, sa morphologie, *etc.*, il est alors possible d'orienter les propriétés du copolymère final.

Notons que l'amination réductrice avec la cystéamine a aussi été testée afin d'introduire un groupement thiol sur les XOS (Figure 20) mais des analyses MALDI-TOF (Figure 21) ont révélé la formation majoritaire d'un coproduit non fonctionnel.

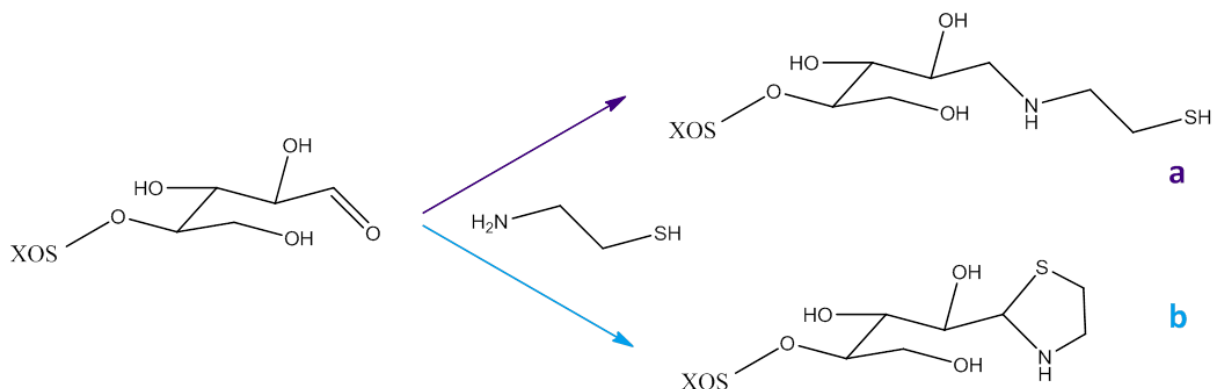


Figure 20. Fonctionnalisation de l'extrémité réductrice des oligomères par la cystéamine avec le produit désiré (a) et le coproduit majoritaire (b)

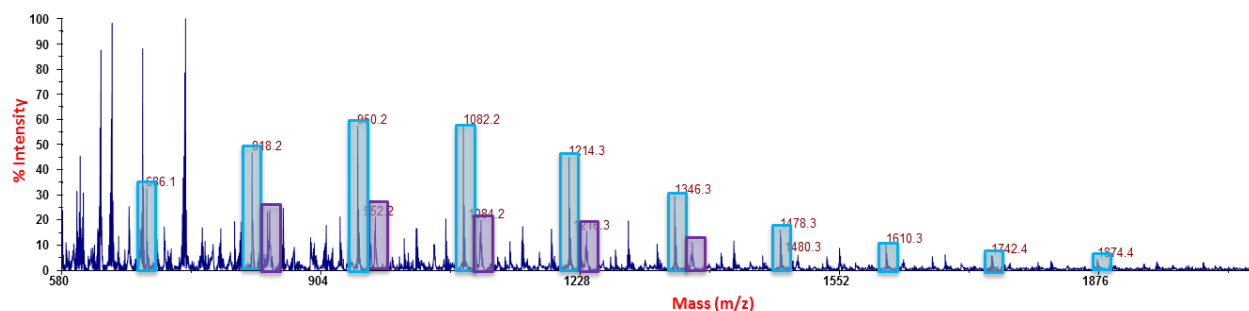


Figure 21. Spectre MALDI-TOF des produits de réactions entre les XOS et la cystéamine avec le produit désiré (a) en violet et le coproduit (b) en bleu

Conclusion

Dans ce troisième chapitre, la modification de xylanes par oxydation au periodate de sodium a été réalisée pour leur apporter de nouvelles fonctionnalités. Les effets de trois paramètres réactionnels sur la cinétique d'oxydation et sur la masse molaire du produit oxydé ont été étudiés. Il a été montré que les xylanes issus du hêtre pouvaient être oxydés à un taux de periodate de 20 mol.% sans dépolymérisation significative. L'étude a également montré qu'une hausse de la température entraîne une augmentation de la cinétique de réaction sans dégradation du polymère jusqu'à 80°C. Une augmentation de la concentration en xylanes permet aussi de réduire les temps de réaction, mais des agrégats sont alors formés. La concentration en xylanes ne devrait pas dépasser 100 g/L et l'agitation doit être correctement maîtrisée afin d'éviter la formation d'agrégats. Finalement, il a été montré que l'oxydation au periodate est reproductible et que le DO peut être modulé en fonction du taux de periodate utilisé pour faire la réaction.

Pour le dosage des fonctions aldéhyde formées, la méthode à l'hydroxylamine est simple et fiable à condition d'avoir un taux d'aldéhyde assez élevé. Il est aussi possible de faire réagir les aldéhydes par amination réductrice pour les fonctionnaliser avec un groupe facilement détectable par RMN, tel un groupe benzyle. L'intégration des signaux RMN permet alors d'estimer le degré d'oxydation qui correspond alors au degré de substitution. Une fois les espèces oxydées, un greffage des chaînes par amination réductrice des groupements aldéhyde permettra d'obtenir de nouveaux biomatériaux fonctionnels.

L'amination réductrice a également été réalisée sur l'extrémité réductrice des XOS. Cette réaction a permis de fonctionnaliser les XOS par des groupements allyle ou azoture. Ces XOS fonctionnels seront utilisés comme blocs hydrophiles pour la synthèse d'oligomères amphiphiles. Grâce à l'amination réductrice, la fonctionnalisation des xylanes et XOS oxydés permettra l'accès à des copolymères amphiphiles en peigne.

Références

- [1] Gomez CG, Rinaudo M, Villar MA. Oxidation of sodium alginate and characterization of the oxidized derivatives. *Carbohydr Polym* 2007;67:296–304.
- [2] Babor K, Kalac V, Tihlarik K. Periodate oxidation of saccharides . III . * Comparison of the methods for determining the consumption of sodium periodate and the amount of formic acid formed 1973;27:676–80.
- [3] Zhao H, Heindel ND. Determination of degree of substitution of formyl groups in polyaldehyde dextran by the hydroxylamine hydrochloride method. *Pharm Res* 1991;8:400–2.
- [4] Sarymsakova AA, Nadzhimutdinov S, Tashpulatov YT. Chemical transformations in the chains of cellulose dialdehydes and cellulose ethers. *Chem Nat Compd* 1998;34:170–4.
- [5] Kristiansen KA, Potthast A, Christensen BE. Periodate oxidation of polysaccharides for modification of chemical and physical properties. *Carbohydr Res* 2010;345:1264–71.
- [6] Vold IMN, Kristiansen KA, Christensen BE. A study of the chain stiffness and extension of alginates, in vitro epimerized alginates, and periodate-oxidized alginates using size-exclusion chromatography combined with light scattering and viscosity detectors. *Biomacromolecules* 2006;7:2136–46.
- [7] Upadhyay KK, Meins JF Le, Misra A, Voisin P, Bouchaud V, Ibarboure E, et al. Biomimetic Doxorubicin Loaded Polymersomes from Hyaluronan-block-Poly(γ -benzyl glutamate) Copolymers. *Biomacromolecules* 2009;10:2802–8.
- [8] Daus S, Elschner T, Heinze T. Towards unnatural xylan based polysaccharides: reductive amination as a tool to access highly engineered carbohydrates. *Cellulose* 2010;17:825–33.
- [9] Guerry A, Bernard J, Samain E, Fleury E, Cottaz S, Halila S. Aniline-Catalyzed Reductive Amination as a Powerful Method for the Preparation of Reducing End-“Clickable” Chitooligosaccharides. *Bioconjug Chem* 2013;24:544–9.
- [10] Schatz C, Louguet S, Le Meins J-F, Lecommandoux S. Polysaccharide-block-polypeptide Copolymer Vesicles: Towards Synthetic Viral Capsids. *Angew Chemie Int Ed* 2009;48:2572–5.
- [11] Kristiansen KA, Schirmer BC, Aachmann FL, Skjåk-Bræk G, Draget KI, Christensen BE. Novel alginates prepared by independent control of chain stiffness and distribution of G-residues: Structure and gelling properties. *Carbohydr Polym* 2009;77:725–35.
- [12] Sanderson CJ, Wilson D V. Methods for coupling protein or polysaccharide to red cells by periodate oxidation. *Immunochemistry* 1971;8:163–8.

- [13] Du M, Hindsgaul O. Novel Hybrid Morpholino-Glycopeptides with the Amino Acid Nitrogen Replacing C-3 of the Pyranose Ring. *Synlett* 1997;1997:395–7.
- [14] Lane FC. Sodium Cyanoborohydride - A highly selective reducing agent for organic functional groups. *Synthesis (Stuttg)* 1975;3:135–46.
- [15] Johnson Jr. CS. Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: Principles and applications. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 1999;34:203–56.
- [16] Stilbs P. Molecular self-diffusion coefficients in Fourier transform nuclear magnetic resonance spectrometric analysis of complex mixtures. *Anal Chem* 1981;53:2135–7.

Chapitre IV

Synthèse des oligomères amphiphiles



©CNRS Photothèque / Cyril FRESILLON

Purification des oligomères amphiphiles par dialyse

Dans ce chapitre de thèse, le couplage de dérivés d'ester gras avec ceux des xylanes a été étudié afin d'obtenir des composés bio-sourcés et présentant, entre autres, un caractère amphiphile. Ce chapitre traite en premier de la synthèse des dérivés d'ester gras fonctionnels, à partir de l'oléate de méthyle et du ricinoléate de méthyle. La seconde partie développe le couplage de ces dérivés avec les oligomères de xylane fonctionnalisés pour l'obtention d'oligomères amphiphiles. Deux voies de couplage différentes ont alors été étudiées, *i.e.* les couplages thiol-ène et azoture-alcyne.

Sommaire

Partie A.	165
Synthèse des dérivés d'ester gras	165
I. Synthèse des dérivés d'ester gras porteurs de la fonction thiol	169
I.1. Synthèse et caractérisation	169
I.2. Comportement thermique	173
II. Synthèse des dérivés d'ester gras porteurs de la fonction alcyne	174
II.1. Synthèse et caractérisation	174
II.2. Comportement thermique	178
Partie B.	181
Les deux voies de couplage par 'chimie click'	181
I. Couplage thiol-ène	182
II. Couplage azoture-alcyne	184
II.1. Synthèse et caractérisation	184
II.2. Comportement thermique	186
Conclusion	188
Références	189

Partie A.

Synthèse des dérivés d'ester gras

Les huiles végétales sont facilement accessibles et en grande quantité. Leur production annuelle mondiale a été de l'ordre de 156 millions de tonnes (**Mt**) en moyenne sur la période 2010/13. La production est estimée à 163,3 Mt en 2013/14 et à 188,3 Mt en 2020/21 [1]. Environ 20% de cette production est dédiée à l'industrie, principalement comme source d'énergie, et le reste pour l'alimentation humaine (75%) et animale (5%) [2].

Les huiles végétales sont majoritairement composées de triglycérides qui sont le produit de l'estérification du glycérol avec trois acides gras. Le terme 'huile' se réfère aux triglycérides à l'état liquide à température ambiante. Les huiles sont très hétérogènes en raison d'une très grande variabilité du pourcentage et de la nature des acides gras qui la composent. Leur composition dépend de l'essence de la plante, des conditions de culture mais aussi de l'environnement (sol, climat). La composition en acides gras des principales huiles végétales est présentée dans le Tableau 1. Les acides gras sont obtenus par saponification des triglycérides et les esters méthyliques sont obtenus par méthanolyse (Figure 1). Ces deux voies produisent du glycérol comme coproduit.

Tableau 1. Composition en acides gras des principales huiles végétales

		Arachide (Afrique)	Colza	Maïs	Noisette	Noix	Olive	Pépin de raisin	Soja	Tournesol	Tournesol oléique
Ac. Palmitique	C16:0	8-13	1-5	8-13	5-9	6-8	8-14	7-10	8-13	5-7	3-4
Ac. Margarique	C17:0	< 0,1	-	-	-	< 0,1	< 0,2	-	-	≤ 0,1	-
Ac. Stéarique	C18:0	3-4	1-2	1-4	1-4	1-3	3-6	3-6	3-6	4-6	3-4
Ac. Arachidique	C20:0	1-2	< 1	< 1	< 0,3	< 0,3	< 0,5	< 0,3	< 1,2	< 1	0,2-0,5
Ac. Béhénique	C22:0	2-4	< 0,5	< 0,5	-	< 0,2	< 0,9	< 0,5	< 0,5	< 1	0,5-1
Ac. Lignocérique	C24:0	1-2	-	-	-	-	-	-	-	-	≤ 0,5
Ac. Gras Saturés		15-25	2-8	10-18	6-13	7-11	13-22	11-17	12-10	11-15	7-10
Ac. Palmitoléique	C16:1 n-7	< 0,3	< 1	< 1	< 0,3	< 0,2	< 1	< 0,5	< 0,2	≤ 0,4	≤ 0,1
Ac. Oléique	C18:1 n-9	48-66	55-62	24-32	66-83	14-21	61-80	14-22	17-26	15-25	75-83
Ac. Gadoléique	C20:1 n-11	1-2	1-2	< 0,5	-	< 0,3	< 0,4	< 0,2	< 0,4	< 0,5	0,1-0,5
Ac. Erucique	C22:1 n-9	-	< 1	-	-	-	-	-	-	-	-
Ac. Gras Monoinsaturés		49-68	56-65	25-33	66-83	14-21	62-81	15-23	18-27	16-26	75-84
Ac. Linoléique	C18:2 n-6	14-28	18-22	55-62	8-25	54-65	3-14	65-73	50-62	62-70	10-21
Ac. Linoléinique	C18:3 n-3	< 0,3	8-10	< 2	< 0,6	9-15	< 1	< 0,5	4-10	≤ 0,2	≤ 0,3
Ac. Gras Polyinsaturés		14-28	26-32	57-64	9-26	63-80	4-15	65-73	54-72	62-70	10-22

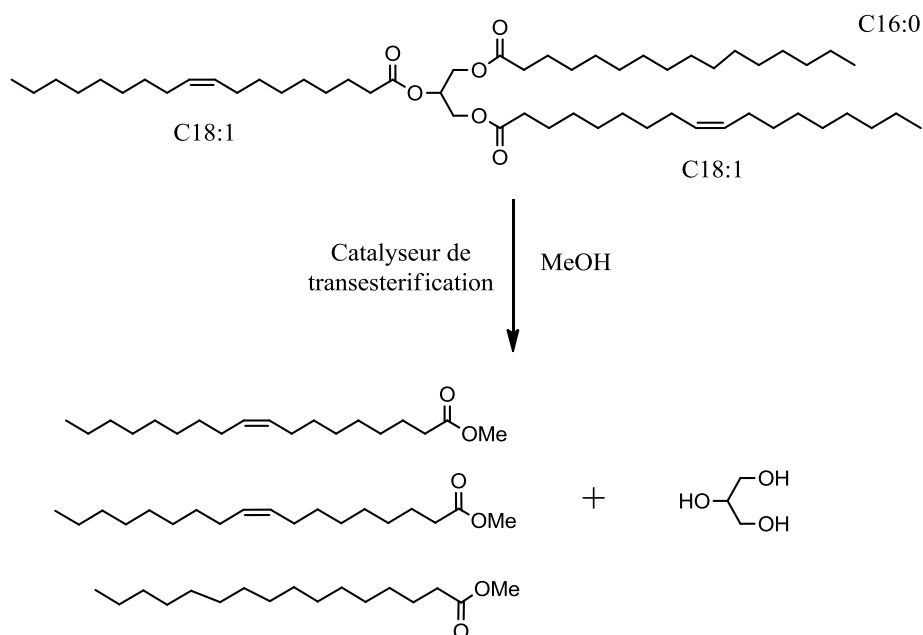


Figure 1. Obtention d'esters méthyliques par transestérification d'un triglycéride typique de l'huile d'olive

Les chaînes grasses sont ensuite purifiées par distillation fractionnée, et sont classées en trois catégories (Figure 2):

- les acides gras saturés comme l'acide palmitique C16:0 à environ 43% dans l'huile de palme,
- les acides gras mono-insaturés comme l'acide oléique C18:1 à environ 75% dans l'huile d'olive,
- les acides gras polyinsaturés comme l'acide linoléique C18:2 à environ 67% dans l'huile de tournesol.

L'huile de ricin possède la particularité d'être composée à environ 85% d'acide ricinoléique, C18:1(OH), ce qui en fait l'huile naturellement la plus pure. L'acide ricinoléique possède une double liaison entre les carbones 9 et 10 et une fonction hydroxyle en position 12. Cette 'triple fonctionnalité' (–COOH, C=C et –OH) rend cet acide gras très intéressant pour la chimie des polymères. La variété 'high oleic' de l'huile de tournesol est aussi très utilisée car elle possède près de 80% d'acide oléique (C18:1).

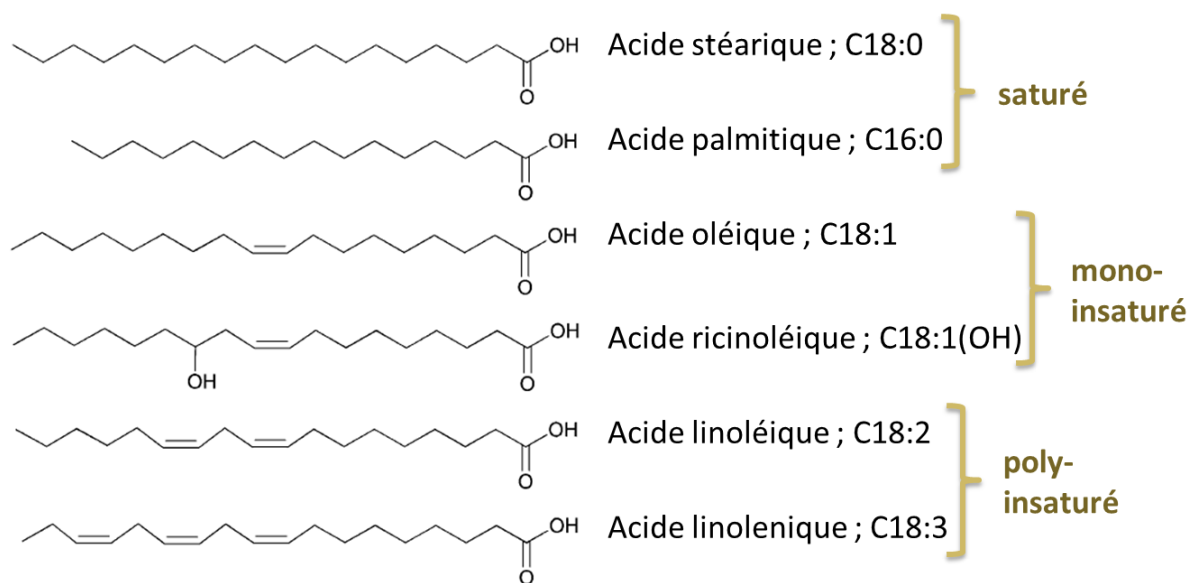


Figure 2. Structure et classification des principaux acides gras

De nombreux articles et revues traitent de la fonctionnalisation des triglycérides et acides gras pour la synthèse de polymères bio-sourcés [3–10]. Les deux sites réactifs principaux des acides (ou esters) gras sont la (ou les) insaturation(s) et la fonction acide (ou ester). Les principales réactions de dérivatisation se font *via* les insaturations et sont l'oxydation, l'hydroformylation, l'ozonolyse ou encore l'époxydation. Généralement, ces différentes réactions sont utilisées pour greffer des fonctions alcool ou amine sur les acides ou esters gras et ainsi permettre la synthèse de polymères par polycondensation (polyester ou polyamide, respectivement). Les insaturations peuvent aussi être le lieu de réaction de métathèse, réaction couramment employée pour la synthèse de corps gras difonctionnels (acide, ester, alcool), pouvant ensuite être polymérisés [11]. Dans la suite de ce travail de thèse, une autre réaction de type 'click' engageant l'insaturation, a été utilisée, à savoir la réaction de type thiol-ène [5,12–14]. Il s'agit d'un mécanisme radicalaire pouvant être amorcé sous irradiation UV ou par un amorceur radicalaire, typiquement la DMPA (activation UV) ou l'AIBN (activation thermique). L'addition du radical thiol engendre alors la synthèse d'isomères (Figure 3) [15,16].

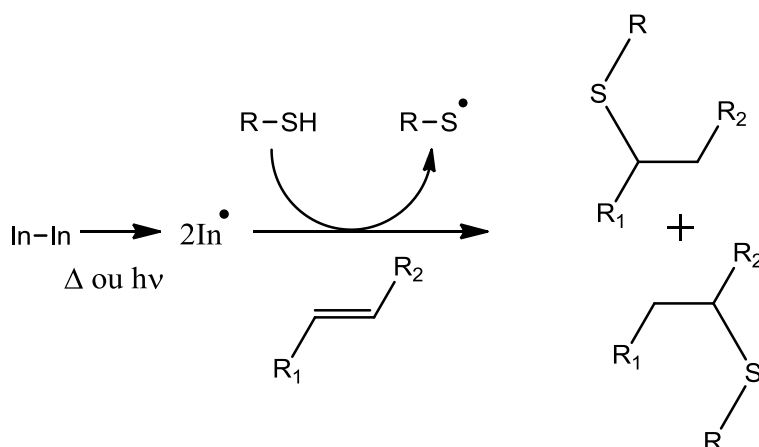


Figure 3. La réaction thiol-ène

Il est aussi possible de faire réagir la fonction acide (ou ester) du corps gras par une réaction de (trans)estérification (Figure 4) [17]. La réaction de transestérification est généralement réalisée en masse, catalysée (TBD, DBTO, TiOBu_4 , LiCl) et chauffée, typiquement à 120°C [18–20].

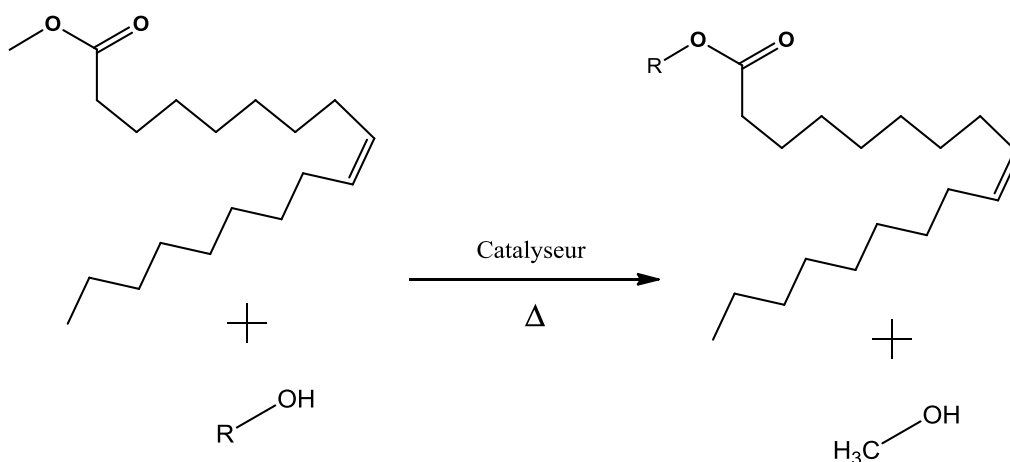


Figure 4. Réaction de transestérification illustrée sur l'oléate de méthyle

Les esters et acides gras possèdent donc de nombreuses possibilités de modifications chimiques permettant d'offrir une vaste gamme de molécules bio-sourcées hydrophobes fonctionnelles, sans oublier leur caractère biodégradable. Les esters gras utilisés dans ce travail de thèse sont l'oléate de méthyle (**MeOI**) et le ricinoléate de méthyle (**MeRic**). Ils ont été fonctionnalisés par des groupements thiol ou alcyne puis engagés dans des réactions de couplage avec des XOS porteurs des fonctions antagonistes, donnant accès à des composés bio-sourcés et amphiphiles.

I. Synthèse des dérivés d'ester gras porteurs de la fonction thiol

I.1. Synthèse et caractérisation

Les esters gras porteurs de la fonction thiol ont été synthétisés par réaction thiol-ène, en présence d'éthanedithiol, comme illustré Figure 5. D'autres produits, non représentés sur la Figure 5 peuvent également se former, tels le produit de dimérisation (l'éthanedithiol réagit sur 2 esters gras) ou encore celui résultant du couplage par pont disulfure.

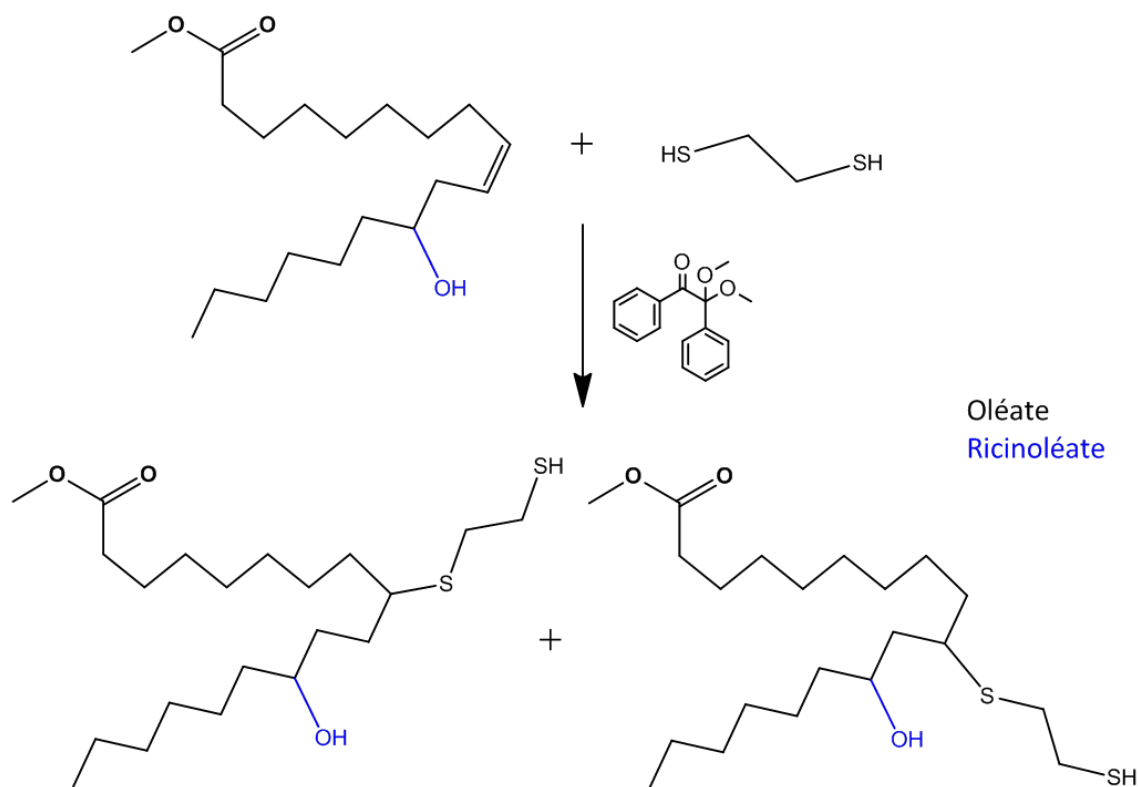


Figure 5. Réaction thiol-ène avec l'éthanedithiol

L'utilisation d'un excès de dithiol permet d'éviter le produit de dimérisation mais pourrait favoriser la formation de ponts disulfure. Différentes quantités de dithiol ont donc été testées – 5, 10 et 20 équivalents par rapport à l'ester gras – et il s'est avéré que l'utilisation de 20 équivalents d'éthanedithiol permettait de diminuer significativement la quantité de dimères comparé à 5 et 10 équivalents, sans augmentation significative du nombre de ponts disulfure. Ces différentes réactions ont été réalisées avec 0,5 équivalent (par rapport à l'ester gras) de photo-amorceur, le 2,2-diméthoxy-2-phénylacétophénone (**DMPA**) et la conversion est totale.

La seconde phase de l'étude a consisté à optimiser la quantité de DMPA : 0,1 équivalent de DMPA est suffisant pour atteindre une conversion totale en 15 min que ce soit avec l'oléate de méthyle (Figure 6) ou le ricinoléate de méthyle (Figure 7). Les spectres RMN montrent très nettement que la conversion est totale avec la disparition des signaux des protons allyliques (en orange) aux alentours de 5,5 ppm et leurs protons voisins (en jaune) à 2,0 ppm. De plus, l'apparition de nouveaux signaux entre 1,4-1,8 ppm et 2,5-2,9 ppm correspond aux protons méthyléniques après fonctionnalisation (en violet). Une analyse RMN HSQC (couplage ^1H - ^{13}C) permet de conclure que le signal à 1,7 ppm (en vert) correspond au proton du groupement $-\text{SH}$ puisqu'il ne corrèle avec aucun carbone.

Pour s'affranchir de l'éthanedithiol toujours en excès après réaction, le produit est purifié par chromatographie flash en phase liquide (FC). Des analyses RMN ^1H avant et après purification permettent d'en attester : l'excès d'éthanedithiol présent avant purification (Figure 6-b et Figure 7-b) disparaît avec la purification (Figure 6-c et Figure 7-c). Le rendement massique de la réaction est alors de 88%.

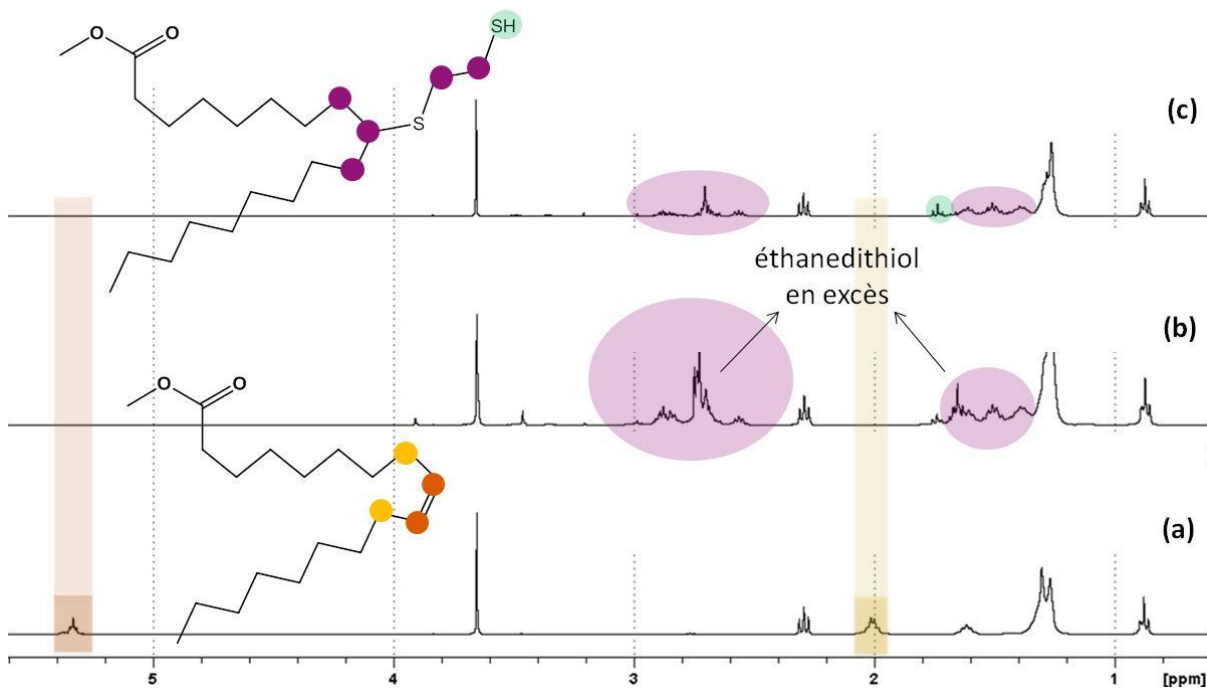


Figure 6. Spectres RMN ^1H du MeOH (a) après réaction thiol-ène avec l'éthanedithiol avant (b) et après (c) purification (CDCl_3)

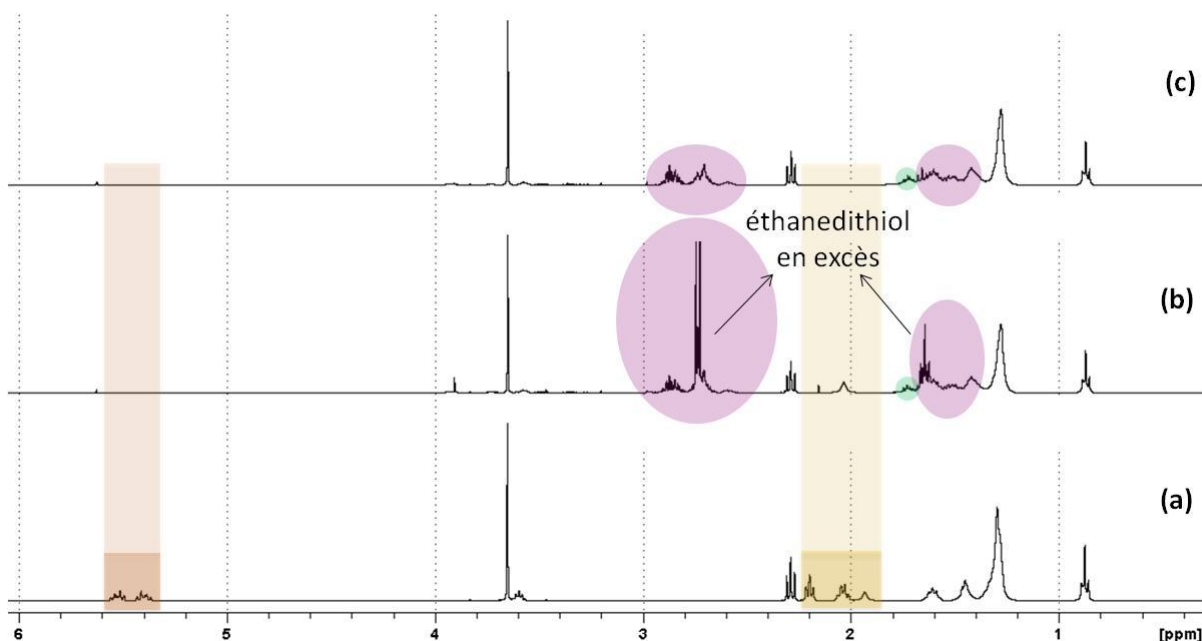


Figure 7. Spectres RMN ^1H du MeRic (a) après réaction thiol-ène avec l'éthanedithiol avant (b) et après (c) purification (CDCl_3)

Les analyses RMN ne permettent pas de conclure sur la présence de produits secondaires, *i.e.* composés avec pont(s) disulfure(s) et dimères. D'autres analyses ont alors été réalisées. Des analyses chromatographiques (SEC-RI avec calibration PSS) dans le THF (Figure 8), montrent que le produit de réaction est relativement pur avec un seul produit majoritaire (pic 2 orange). Ce produit possède une masse molaire supérieure d'environ 100 g/mol à l'ester gras de départ ce qui suggère qu'il s'agit bien de ce dernier fonctionnalisé par l'éthanedithiol (masse molaire de l'éthanedithiol égale à 94,2 g/mol ; calibration PSS). Un composé de masse molaire environ double (pic 1 violet) est également formé correspondant au dimère comme il a été prouvé par analyse ESI (Figure 9). L'analyse en ESI-MS fournit des valeurs de masse exacte, permettant d'affirmer avec certitude que le produit désiré majoritaire (en orange) a bien été synthétisé. Les sous-produits également obtenus sont illustrés Figure 10. Avec le MeOI (Figure 10-a), seulement deux sous-produits ont été obtenus contre trois avec le MeRic (Figure 10-b). Les sous-produits sont ceux attendus, à savoir des dimères exempts de fonctions thiol libres et des dérivés disulfure porteurs d'une fonction thiol.

Au regard de la faible quantité de ces sous-produits, les dérivés MeOI-SH et MeRic-SH largement majoritaires ont été utilisés tels quels pour le couplage thiol-ène.

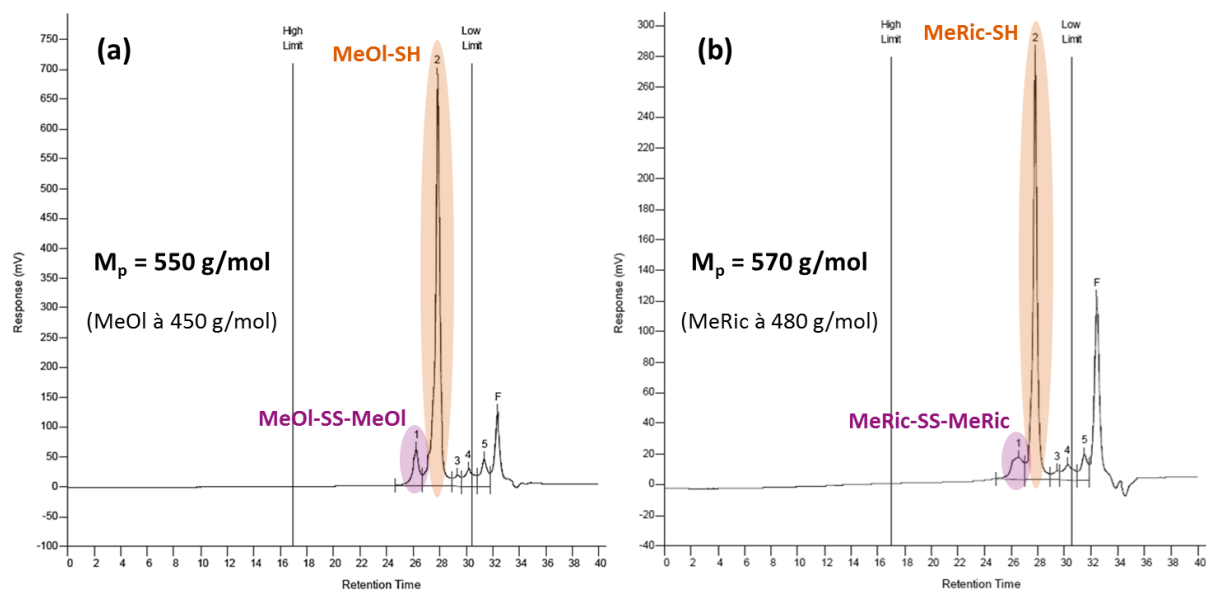


Figure 8. Chromatogrammes SEC à détection RI du MeOI (a) et MeRic (b) après réaction thiol-ène avec l'éthanedithiol (THF ; calibration PSS)

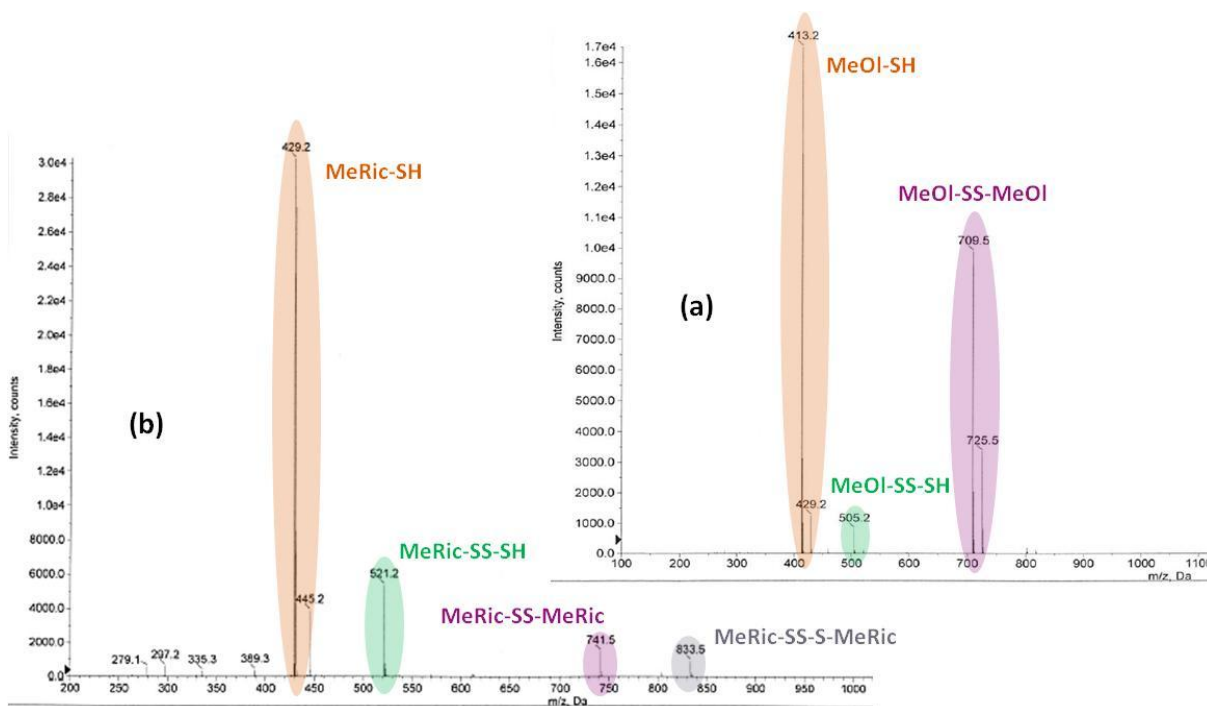


Figure 9. Spectres ESI à détection MS du MeOI (a) et MeRic (b) après réaction thiol-ène avec l'éthanedithiol

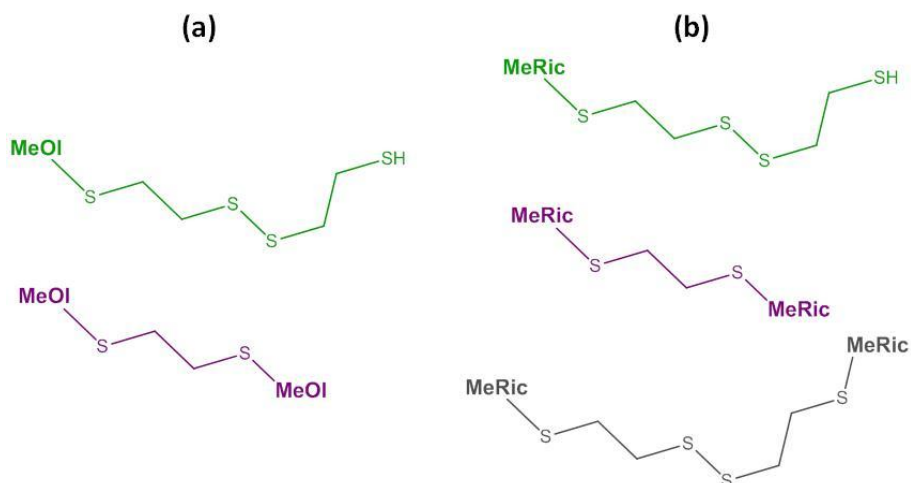


Figure 10. Produits secondaires de la réaction du MeOI (a) et du MeRic (b) avec l'éthanedithiol par thiol-ène

I.2. Comportement thermique

Afin d'étudier l'effet de la fonctionnalisation sur les comportements thermiques des esters gras, les MeOI et MeRic fonctionnalisés thiol ont été analysés par TGA et DSC. Ainsi, les analyses thermogravimétriques (cas du MeOI illustré Figure 11), montrent que la fonctionnalité thiol augmente la stabilité du composé. Dans le cas du MeOI, la température de dégradation maximale (maximum de la dérivée) passe de 235°C à 307°C et dans le cas du MeRic, elle passe de 248°C à 317°C. Ceci peut s'expliquer à la fois par la disparition de la double liaison, sensible à la température et par l'introduction d'atomes de soufre, connus pour augmenter la stabilité thermique.

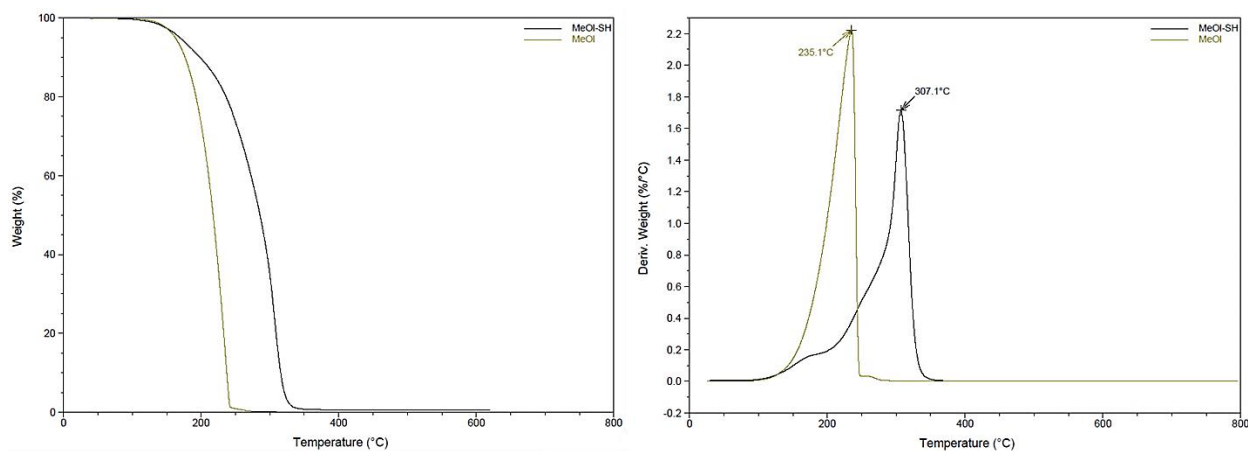


Figure 11. Analyses TGA du MeOI avant et après réaction thiol-ène avec l'éthanedithiol (de 30°C à 800°C sous azote à 10°C/min)

Les analyses DSC des MeOI et MeRic fonctionnalisés thiol (cas du MeOI illustré Figure 12), montrent qu'à l'issue de la fonctionnalisation, les esters gras perdent tout comportement de cristallisation/fusion. L'absence d'insaturation après fonctionnalisation explique ce changement de comportement.

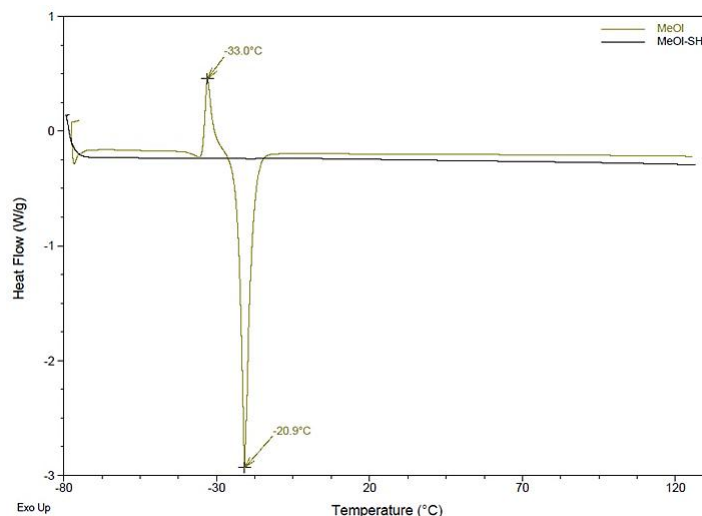


Figure 12. Analyses DSC du MeOI avant et après réaction thiol-ène avec l'éthanedithiol (de -80°C à 130°C à 10°C/min)

II. Synthèse des dérivés d'ester gras porteurs de la fonction alcyne

II.1. Synthèse et caractérisation

Pour le couplage azoture-alcyne, les esters gras doivent être fonctionnalisés par un groupement alcyne. La triple liaison étant elle-même réactive avec les thiols, la réaction thiol-ène précédemment mise au point n'a pas pu être utilisée. Une réaction de transestérification a alors été employée avec le 3-butyn-1-ol comme réactif et le 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ene (**TBD**) comme catalyseur (Figure 13) [20].

En raison du point d'ébullition relativement bas du butynol (129°C), un fort excès de ce dernier a été utilisé (10 équivalents) et la température de réaction a été diminuée à 100°C. Cet excès de réactif et la température de réaction relativement basse vont avoir l'avantage de limiter l'auto-condensation du MeRic, par transestérification sur lui-même, qui peut conduire à des estolides, comme illustré sur la Figure 14.

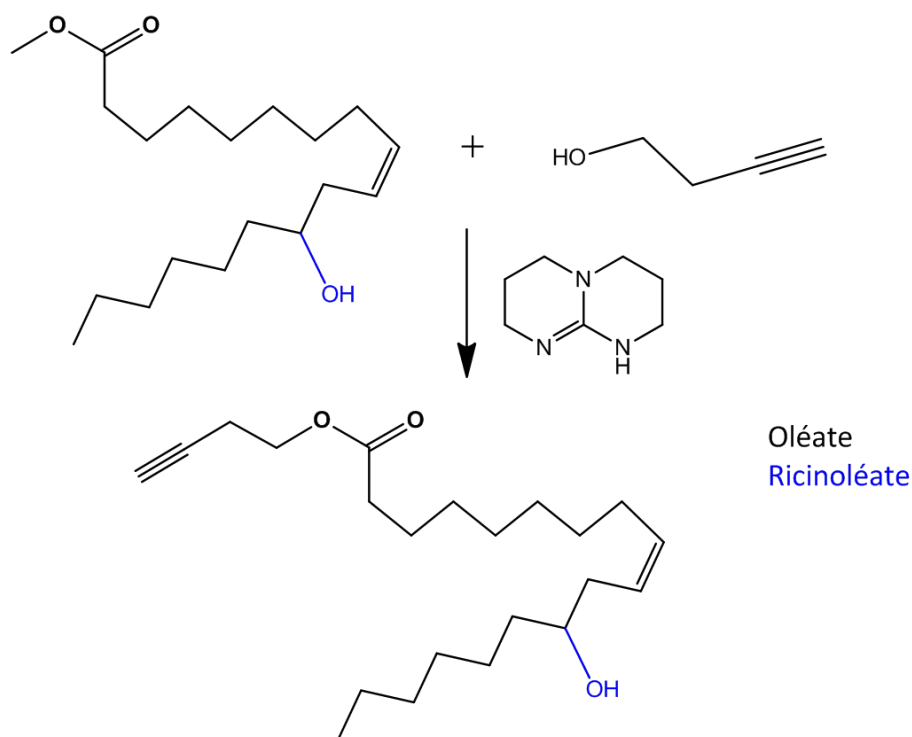


Figure 13. Transestérification avec le butynol

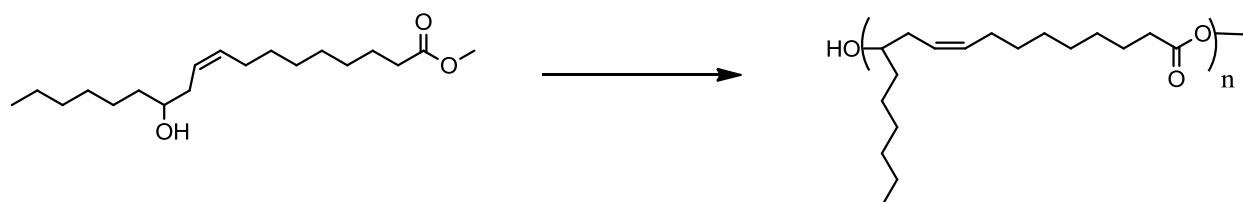


Figure 14. Polymérisation du MeRic par transestérification sur lui-même

Les analyses RMN ^1H (spectres du MeOl, Figure 15 et du MeRic, Figure 16) montrent très nettement que la conversion est totale avec la disparition du signal du $-\text{CH}_3$ de l'ester à 3,62 ppm (en vert) et l'apparition des signaux des protons du butynol à 1,9-2,0 ppm ($\text{H}\equiv$), 2,4-2,5 ppm ($\equiv\text{-CH}_2\text{-}$) et 4,1-4,2 ppm ($-\text{CH}_2\text{-O}$) (jaune, orange et rouge respectivement).

De plus, ces analyses RMN ne montrent aucun signal attribuable soit à la présence de butynol résiduel soit à une éventuelle polymérisation.

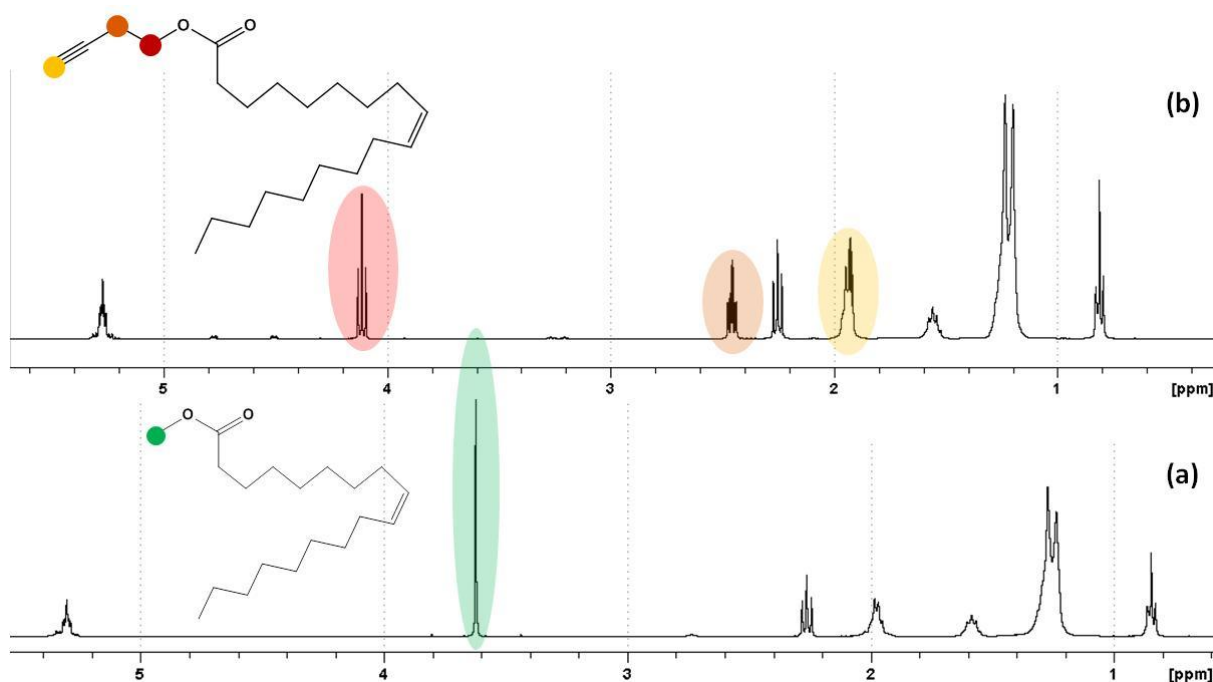


Figure 15. Spectres RMN ^1H du MeOI avant (a) et après (b) transestérification avec le butanol (CDCl_3)

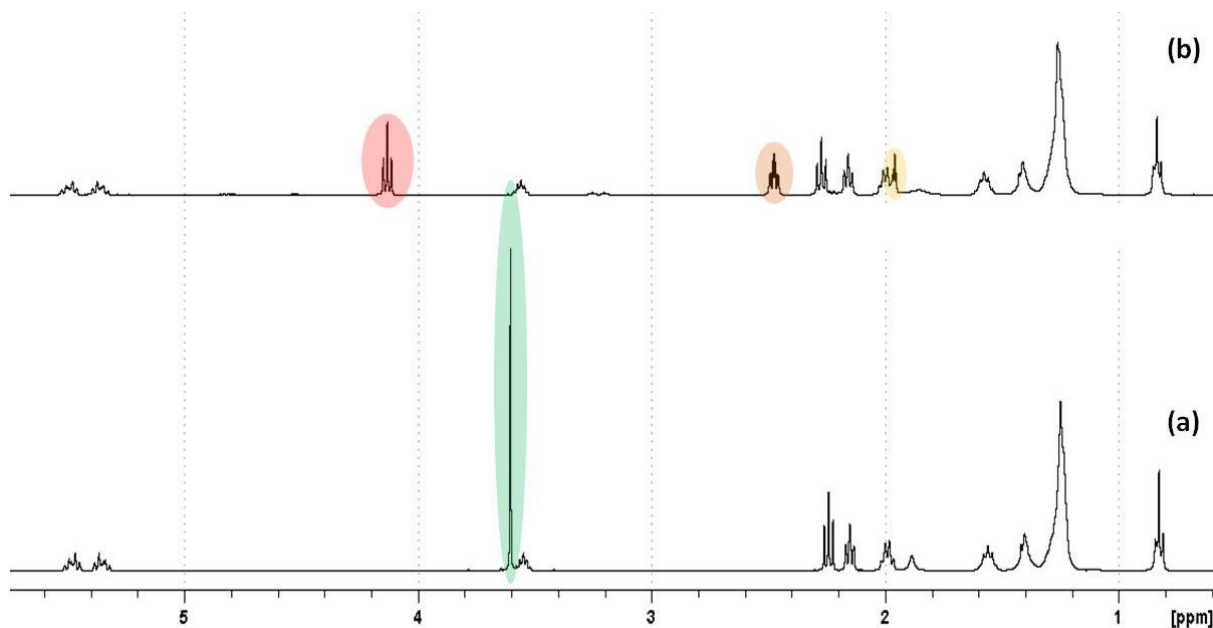


Figure 16. Spectres RMN ^1H du MeRic avant (a) et après (b) transestérification avec le butanol (CDCl_3)

Une analyse SEC-RI dans le THF (Figure 17), montre qu'avec le MeOI, le produit de réaction est très pur (pic 2 orange) et possède une masse molaire d'environ 120 g/mol (calibration PSS) supérieure à celle du MeOI de départ (masse molaire du butynol égale à 70,1 g/mol ; calibration PSS). Cette analyse semble donc montré que l'oléate de butyne (**BuOI**) a bien été obtenu. Pour le MeRic, à côté du signal du ricinoléate de butyne (**BuRic**), un second pic correspondant au

dimère est observé (pic 2 violet), comme cela a été prouvé par des analyses ESI-MS (Figure 18-b). Néanmoins, ce dernier n'est présent qu'en faible quantité.

Les analyses ESI du MeOI (Figure 18-a) montrent de nombreux pics de masse difficile à attribuer. Pour vérifier la pureté des produits, des analyses GC ont finalement été réalisées (Figure 19). Les analyses GC confirment que les produits de transestérification du MeOI et du MeRic avec le butynol sont obtenus avec des puretés satisfaisantes et des rendements massiques d'environ 75% (aucun autre pic n'est présent pour le BuOI, et seul le pic du dimère est présent pour le BuRic).

Ces produits ont donc été utilisés tels quels pour le couplage azoture-alcyne.

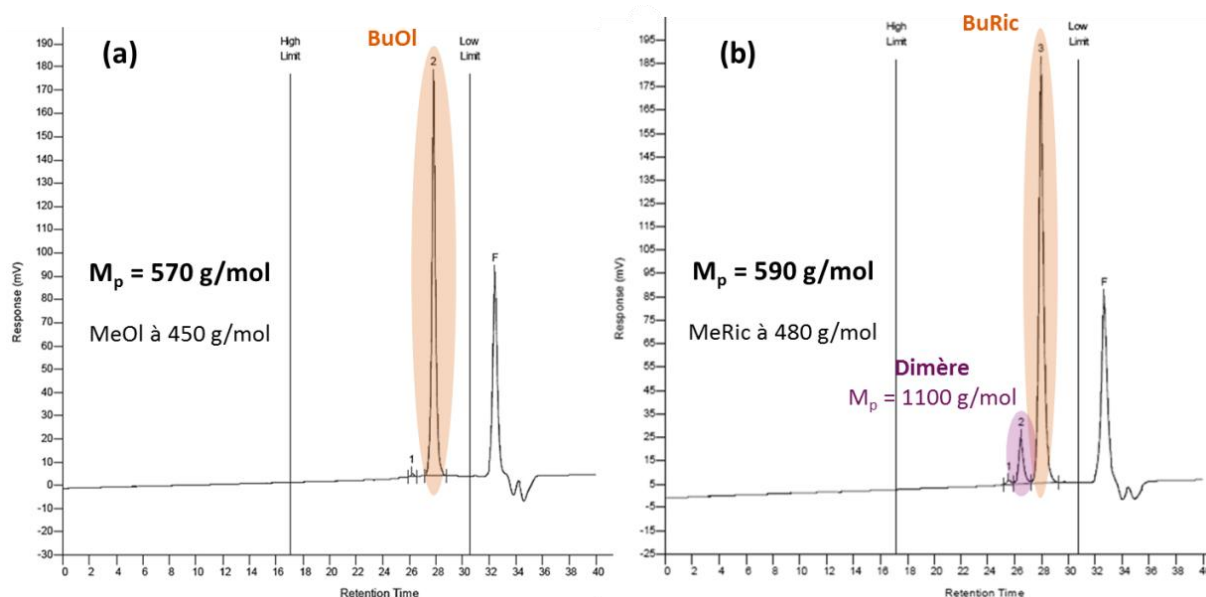


Figure 17. Chromatogrammes SEC à détection RI du MeOI (a) et du MeRic (b) après transestérification avec le butynol (THF; calibration PSS)

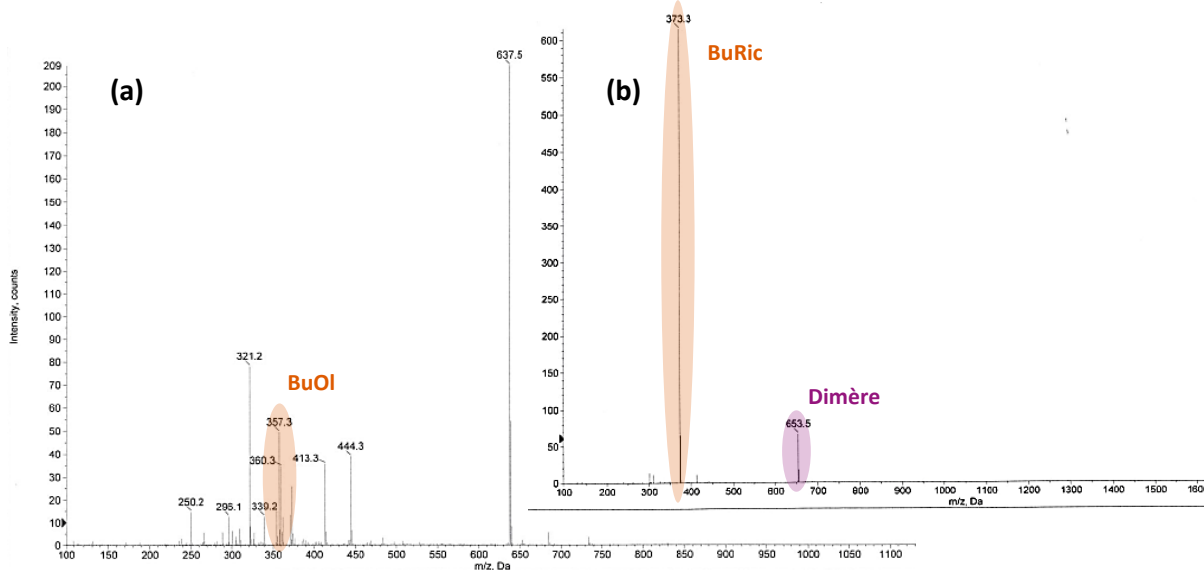


Figure 18. Spectres ESI à détection MS du MeOI (a) et du MeRic (b) après transestérification avec le butynol

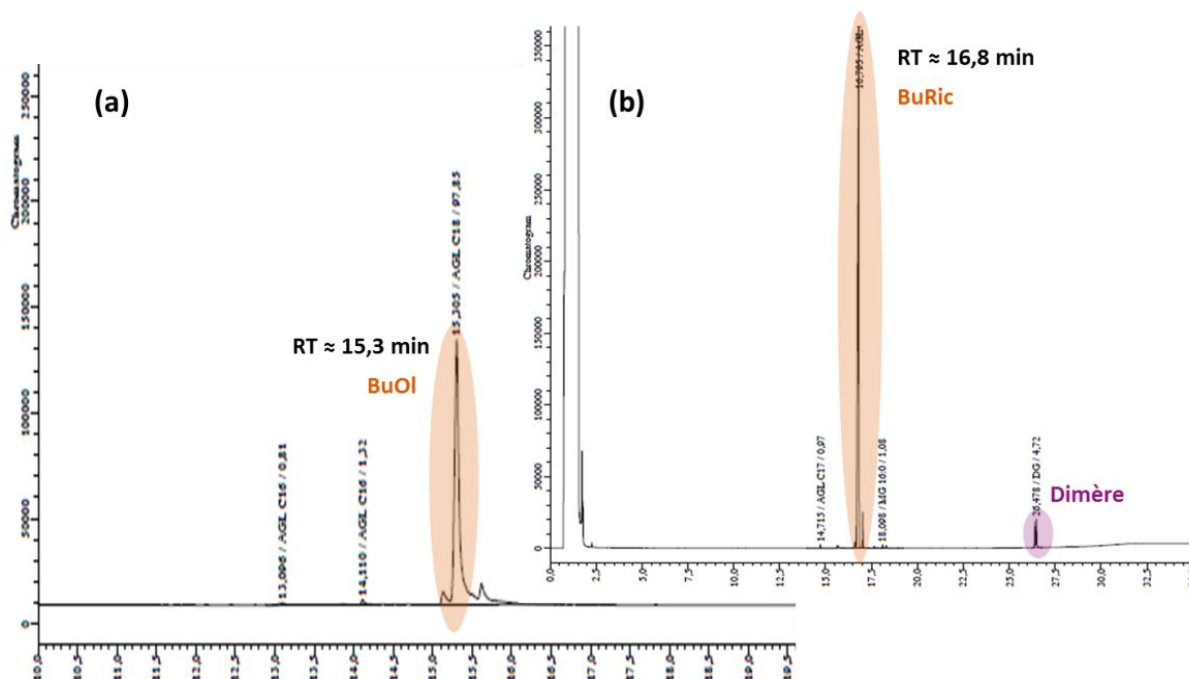


Figure 19. Chromatogrammes GC à détection FID du MeOI (a) et du MeRic (b) après transestérification avec le butynol

II.2. Comportement thermique

Afin d'observer un effet possible de la fonctionnalisation sur les comportements thermiques des esters gras fonctionnalisés alcyne, des analyses TGA et DSC ont été réalisées.

Les analyses thermogravimétriques montrent que le BuOI a une dégradation comparable à celle du MeOI avec cependant une légère augmentation de la stabilité thermique (Figure 20-a). Les températures maximales de dégradation passent de 236°C pour le MeOI à 259°C pour le BuOI (Figure 20-b).

Pour le BuRic, la même tendance est observée (Figure 21-a) et les températures maximales de dégradation passe de 248°C pour le MeRic à 259°C pour le BuRic (Figure 21-b). Néanmoins, le BuRic montre une dégradation en deux étapes avec une seconde dégradation observée à 341°C. Cette dernière pourrait correspondre à la présence de dimère.

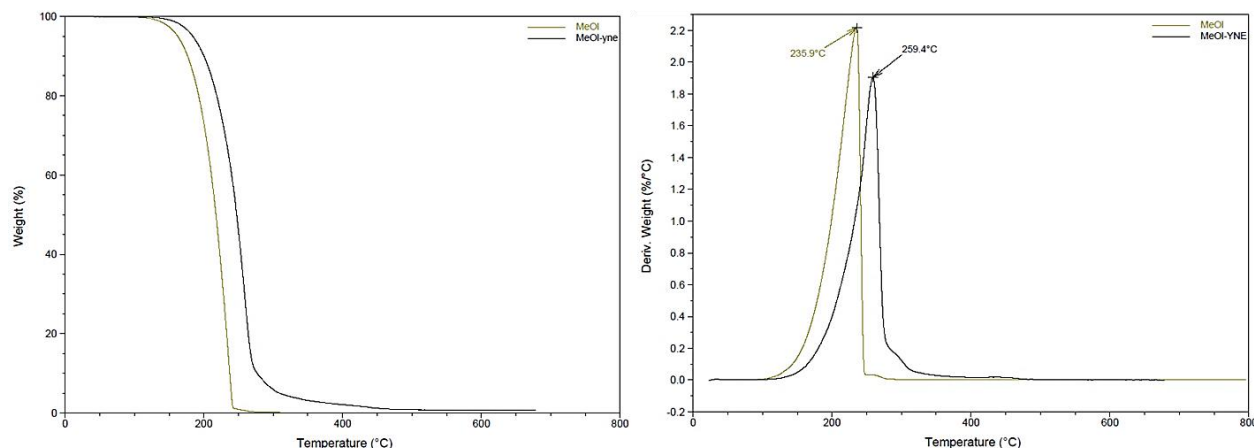


Figure 20. Analyses TGA du MeOI avant et après transestérification avec le butynol (de 30°C à 800°C sous azote à 10°C/min)

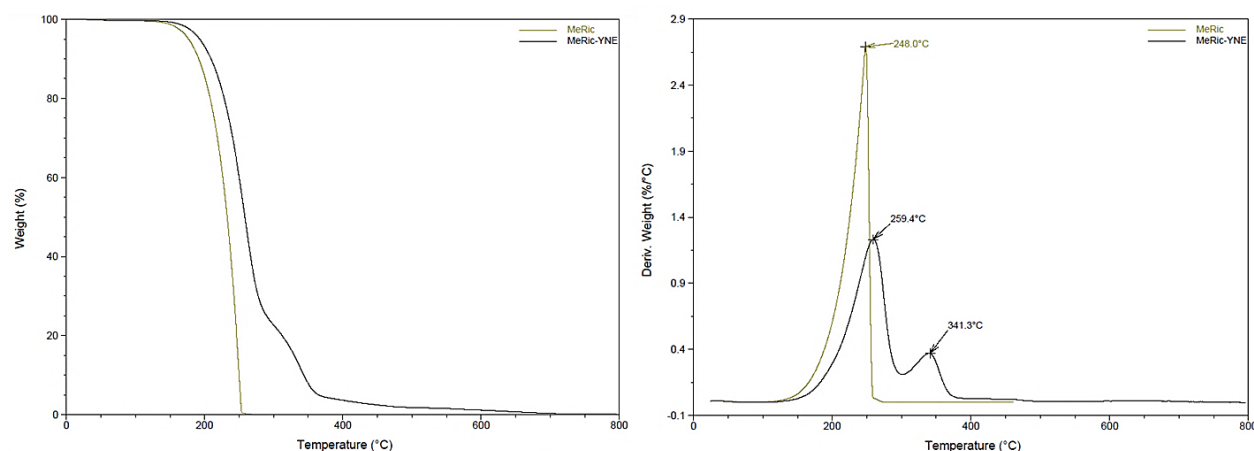


Figure 21. Analyses TGA du MeRic avant et après transestérification avec le butynol (de 30°C à 800°C sous azote à 10°C/min)

La transestérification avec le butynol affecte donc les propriétés thermiques des esters gras. En complément des analyses thermogravimétriques, des analyses calorimétriques des esters de butyle ont été effectuées (Figure 22-a pour le BuOI et b pour le BuRic).

Pour le BuOI (Figure 22-a), ces analyses indiquent une augmentation de la température de fusion qui passe de -21 à -11°C après transestérification.

Pour le MeRic (Figure 22-b), une diminution de la température de fusion, mais aussi deux types de fusion sont observés. La température de fusion du MeRic initialement égale à -4°C passe à -35°C pour la première fusion et à -40°C pour la seconde. Ce dédoublement du pic de fusion indique une modification des comportements thermiques qui pourrait être due à la présence du dimère. Les phénomènes mis en jeu ici, n'ont pas été élucidés.

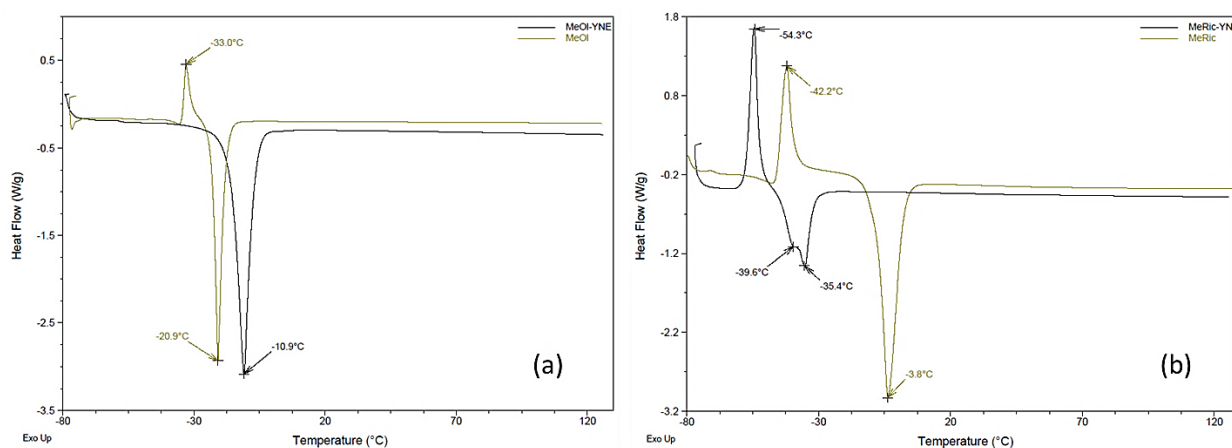


Figure 22. Analyses DSC du MeOI (a) et du MeRic (b) avant et après transestérification avec le butynol (de -80°C à 130°C à $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$)

Partie B.

Les deux voies de couplage par 'chimie click'

Dans un esprit de 'chimie verte', le concept de 'chimie click' a été introduit par Kolb *et al.* en 2001. Les réactions de 'chimie click' sont caractérisées par [21]:

- Une bonne sélectivité,
- Un dispositif expérimental simple avec un minimum d'étapes de synthèse,
- Une application en milieu aqueux et sous oxygène,
- Une tolérance à de nombreux groupements chimiques,
- Des rendements quantitatifs.

La réaction typique de 'chimie click' est la cyclo-addition azoture-alcyne catalysée au Cu(I). Le concept a été étendu à d'autres réactions telles que les substitutions nucléophiles, les additions radicalaires dont fait partie le couplage thiol-ène, les additions de Michael ou encore les réactions de Diels-Alder (Figure 23) [22].

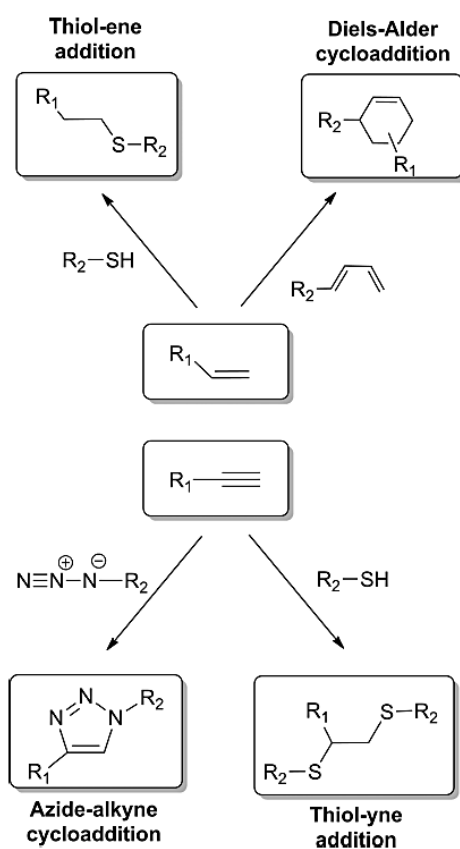


Figure 23. Illustration des principales réactions de 'chimie click' [22]

Les dérivés d'esters gras fonctionnalisés soit par un groupement thiol soit par une fonction alcyne ont ainsi été couplés aux XOS fonctionnels décrits dans le chapitre III. Les couplages ont été réalisés soit par réaction de type thiol-ène ou par réaction de cyclo-addition azoture-alcyne.

I. Couplage thiol-ène

Pour le couplage thiol-ène (**TE**), illustré Figure 24, les XOS porteurs d'un groupement allyle sont mis à réagir avec les dérivés d'ester gras porteurs d'une fonction thiol.

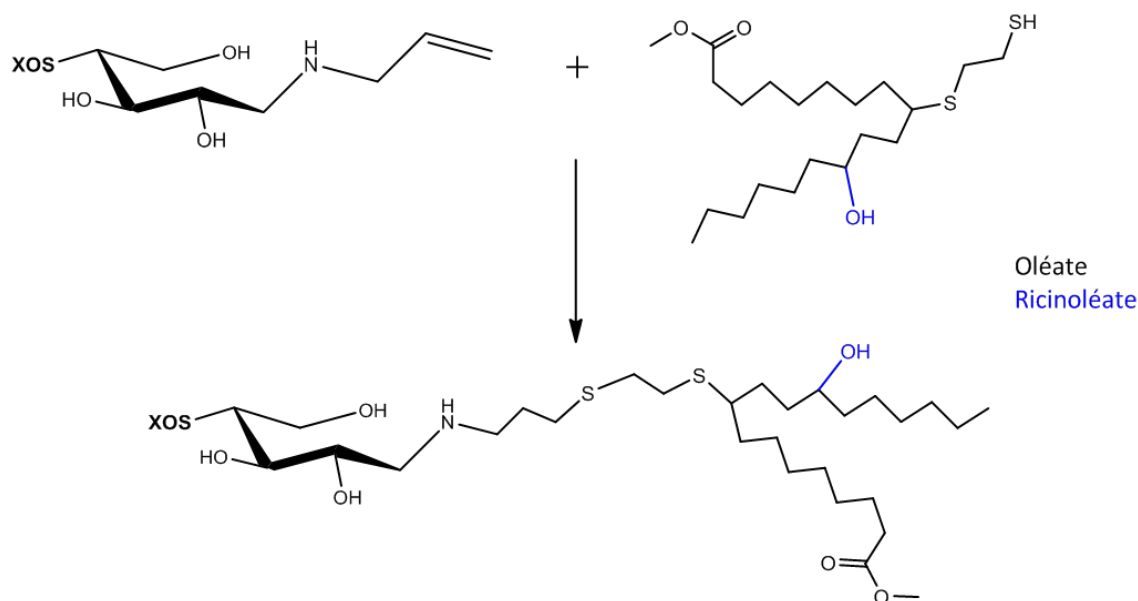


Figure 24. Illustration du couplage TE entre les XOS et les esters gras porteurs de la fonction thiol

La réaction de couplage a été réalisée dans le méthanol, bon solvant des deux réactifs et facile à éliminer. Les conditions de réaction ont été optimisées avec le MeOI. Les essais ont été conduits à 0,75 équivalents de DMPA et 15 équivalents de MeOI-SH. Après lavage à l'EtOH, le produit a été analysé par RMN ¹H dans D₂O pour vérifier si la totalité des XOS ont bien réagi. Plus précisément, le signal correspondant au proton de la double liaison (entre 5,85 et 6,05 ppm) est comparé au proton en position 1 des XOS (Figure 25).

Un premier essai, mené à 10 g/L en XOS dans le méthanol et laissé agiter pendant 1h dans le réacteur sous irradiations UV, a montré par analyse RMN une très faible conversion (essai 1 en bleu Figure 25). Pour augmenter la conversion, différents essais ont alors été réalisés en

augmentant la concentration en XOS et la durée de réaction, de plus, le réactif et l'amorceur ont été ajoutés en plusieurs fois. Les différents essais et analyses RMN se trouvent Figure 25. Le dernier essai (essai 4 en violet Figure 25) permet d'atteindre une conversion satisfaisante sans toutefois être totale.

Couplages TE :

- essai 1** : [XOS] = 10 g/L ; durée 1h
ajout des réactifs et amorceur en 1 fois
- essai 2** : [XOS] = 50 g/L ; durée 3h
ajout des réactifs et amorceur en 1 fois
- essai 3** : [XOS] = 50 g/L ; durée 6h
ajout des réactifs et amorceur en 5 fois
- essai 4** : [XOS] = 50 g/L ; durée 24h
ajout des réactifs et amorceur en 5 fois

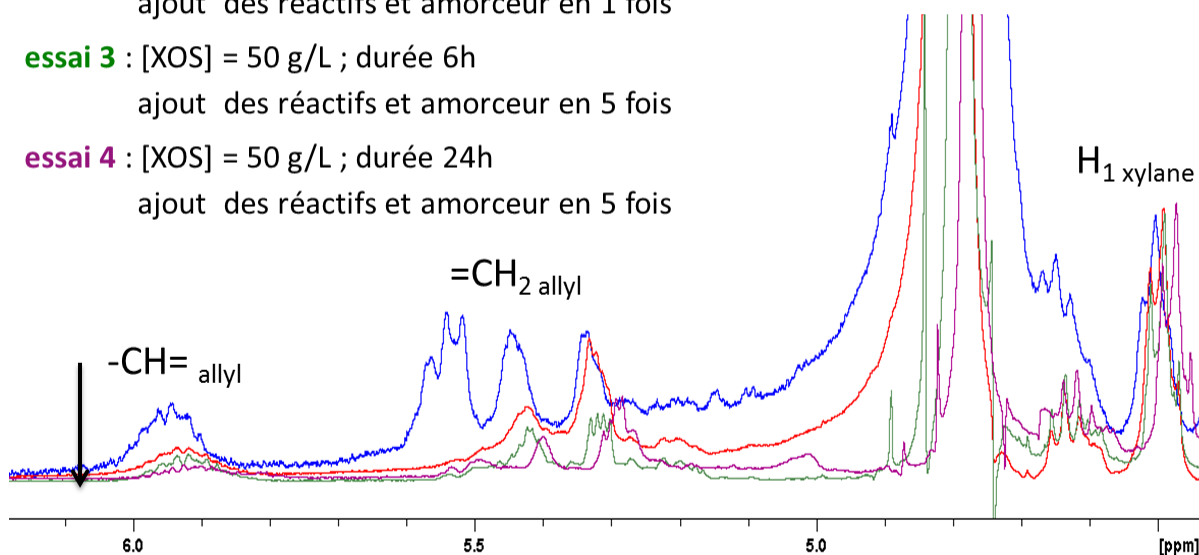


Figure 25. Zoom des spectres RMN des différents essais de couplage TE illustrant une augmentation de la conversion (D_2O)

Dans les conditions de l'essai 4, la conversion est satisfaisante, malgré la présence résiduelle de XOS non couplés au MeOl. Afin de purifier les composés amphiphiles ainsi obtenus, avec un rendement massique de l'ordre de 72%, le produit a été solubilisé dans le DMSO puis dialysé (membrane 500 kDa) pendant 4 jours, mais l'analyse RMN ne montre aucune amélioration de la pureté. Le rendement massique chute alors à 30%. Il est possible que cette forte baisse de rendement soit due aux manipulations du produit lors de la dialyse mais il n'est pas à exclure qu'il y ait aussi des macromolécules qui passent à travers la membrane de 500 kDa.

Ces derniers résultats n'ayant été obtenus qu'en toute fin de thèse, le couplage avec le MeRic fonctionnalisé n'a pas été effectué.

II. Couplage azoture-alcyne

II.1. Synthèse et caractérisation

Pour le couplage azoture-alcyne (AA), illustré Figure 26, les XOS fonctionnalisés par un groupement azoture sont mis à réagir avec les BuOl et BuRic.

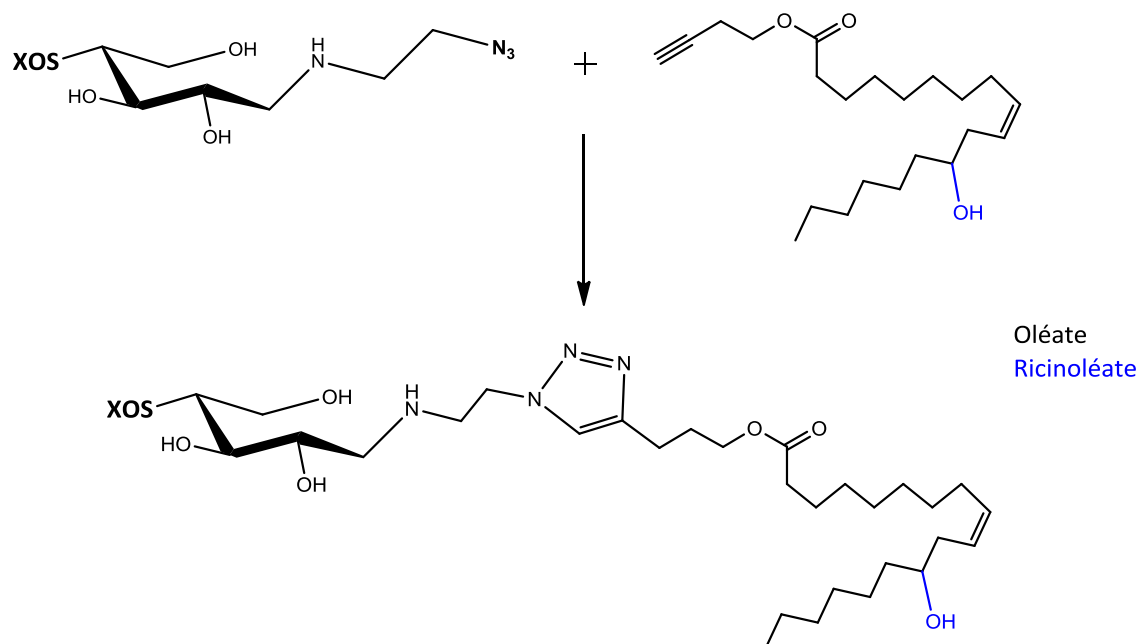


Figure 26. Illustration du couplage AA entre les XOS et les esters gras porteurs de la fonction alcyne

Le couplage AA a été réalisé avec le BuOl et le BuRic d'après un protocole adapté de celui précédemment mis au point au laboratoire [23]. Ce protocole fait intervenir une étape de dialyse qui permet d'échanger le solvant de réaction, le DMSO, par de l'eau. Le rendement massique de la réaction est de l'ordre de 30%. Ce faible rendement, s'explique par l'étape de dialyse (membrane 500 kDa) car les composés amphiphiles restent de taille faible et passeraient à travers la membrane. Les spectres FTIR des deux systèmes obtenus (Figure 27-a et b) montrent clairement la disparition de la bande d'absorption de la fonction azoture à 2110 cm⁻¹, visible seulement sur le spectre des XOS fonctionnalisés (Figure 27-o), ainsi que l'apparition de bandes propres aux corps gras (C=O à 1730 cm⁻¹ et CH₂: vibrations asymétriques à 2920 cm⁻¹ et symétriques à 2650 cm⁻¹) et au cycle de l'addition de Huisgen (C-N à 1380 cm⁻¹), prouvant le succès du couplage.

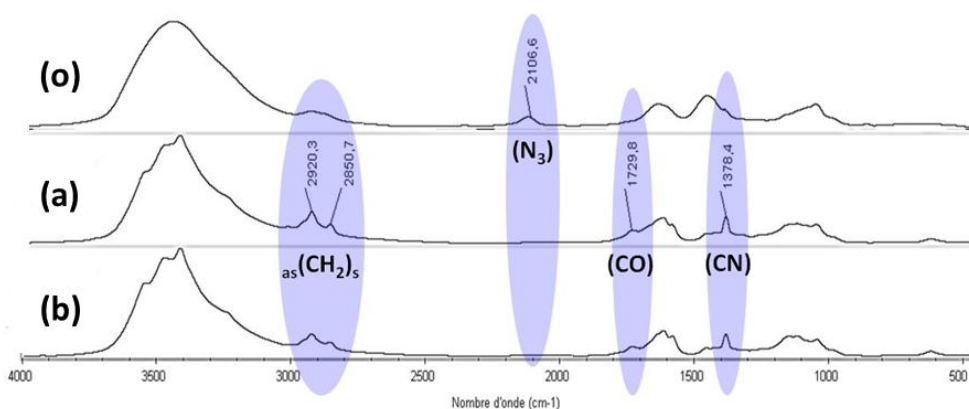


Figure 27. Spectres FTIR des XOS fonctionnalisés azoture avant (o) et après couplage avec le BuOI (a) ou le BuRic (b)

Les deux polymères ont été analysés par RMN ^1H à la fois dans D_2O et dans CDCl_3 (système avec le BuOI en Figure 28 et avec le BuRic en Figure 29). Les analyses donnent des résultats similaires pour les deux systèmes :

- Dans le chloroforme deutéré, seuls des signaux dans la région de ceux des corps gras sont visibles (0,5-2,5 ppm). Il est alors probable que les macromolécules soient organisées en objets avec les chaînes grasses à la surface, en effet, le chloroforme est un mauvais solvant des XOS. De plus, le chloroforme étant un solvant propice à la formation de liaisons hydrogène, les XOS se trouvant à l'intérieur de l'objet sont alors fortement liés entre eux. Ceci conduit à l'obtention d'objets à cœur très dense, les segments XOS ne sont alors pas mobiles, l'intensité de leurs signaux RMN est réduite voire même absente [24,25].
- Dans l'eau deutérée, les signaux correspondant aux XOS sont cette fois-ci visibles (3,0-5,5 ppm). Ceux des corps gras sont toujours visibles mais moins bien définis que dans le chloroforme. Dans ce cas là, les objets obtenus sont plus mous et le cœur des objets, composés des chaînes grasses, est alors visible en RMN mais les signaux sont mal définis.

Notons que c'est le même échantillon qui a été analysé dans le chloroforme puis dans l'eau. Ces oligomères amphiphiles semblent donc s'auto-assembler en deux types d'objets distincts, et ceci de manière totalement réversible [26]. L'expression du caractère amphiphile de ces deux systèmes sera étudiée dans le prochain chapitre.

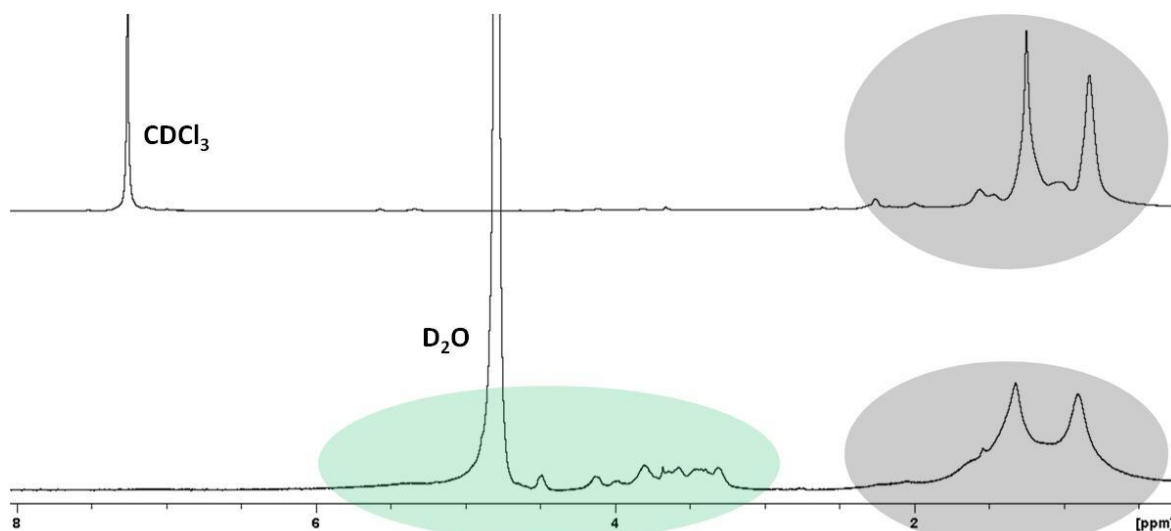


Figure 28. Spectres RMN ^1H du système XOS-Ol dans CDCl_3 (en haut) et dans D_2O (en bas)

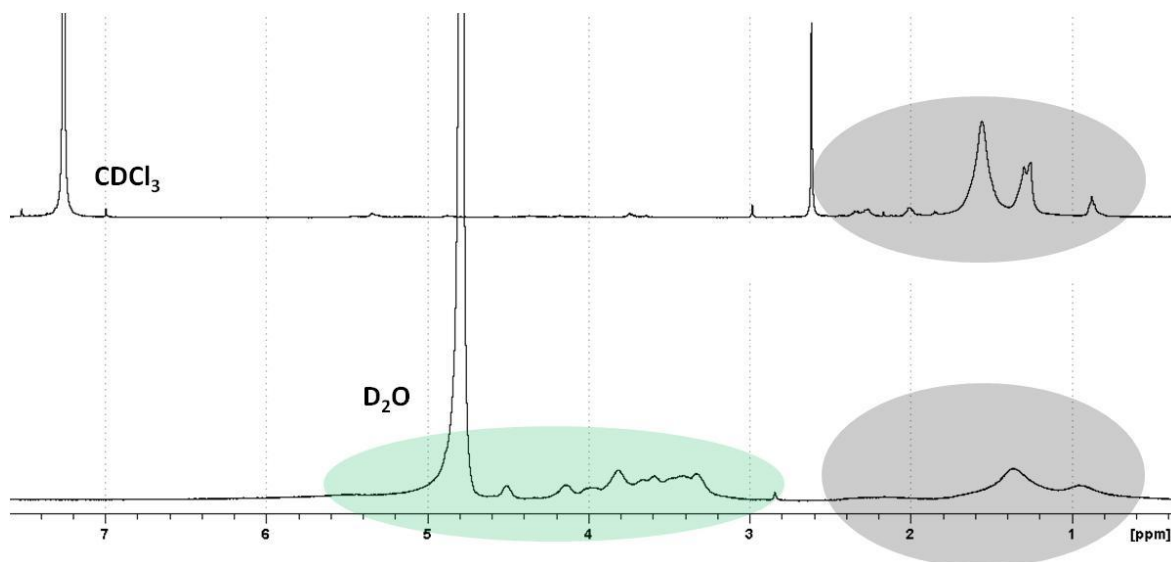


Figure 29. Spectres RMN ^1H du système XOS-Ric dans CDCl_3 (en haut) et dans D_2O (en bas)

II.2. Comportement thermique

Les polymères ainsi obtenus ont finalement été analysés par TGA et DSC pour comparer leurs comportements thermiques à ceux des XOS. Quel que soit le système considéré (avec le segment 'oléate' ou 'ricinoléate'), les thermogrammes obtenus par TGA montrent que les stabilités thermiques des XOS avant ou après couplage sont similaires (Figure 30-a pour le système XOS-Ol et Figure 31-a pour le système XOS-Ric).

La dégradation du catalyseur utilisé pour le couplage est également observée entre 720°C et 780°C avec une température de dégradation maximale égale à 745°C (Figure 30-b pour XOS-Ol

et Figure 31-b pour XOS-Ric). En effet, le sulfate de cuivre (II) se décompose en oxyde de cuivre (II) et trioxyde de soufre entre 700°C et 900°C [27]. Ce dernier n'a donc pas été totalement éliminé par dialyse. Sa dégradation représente environ 10% de perte de masse qui sera prise en considération lors de la préparation des solutions pour l'étude physico-chimique de ces composés (Chapitre V).

Les thermogrammes DSC ne montrent aucun phénomène thermique comme c'était le cas pour les XOS (chapitre II, Partie C). Cela signifie qu'il n'y a plus de BuOI ou BuRic libre dans le produit de réaction. En effet, ces derniers présentent une cristallisation/fusion qui n'est plus visible.

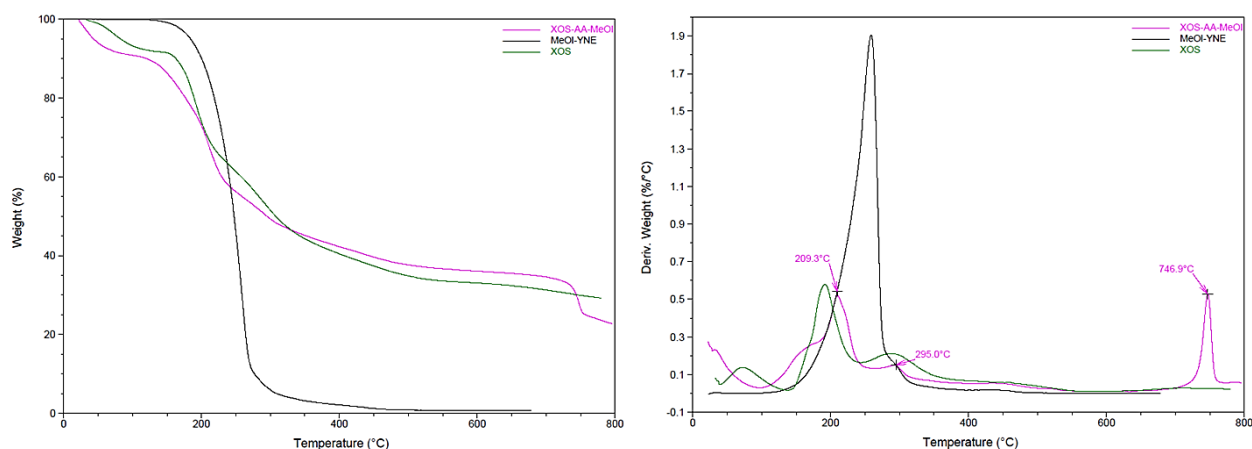


Figure 30. Analyses TGA des XOS (en vert), du BuOI (en noir) et du système XOS-OI (rose) réalisées de 30°C à 800°C sous azote à 10°C/min

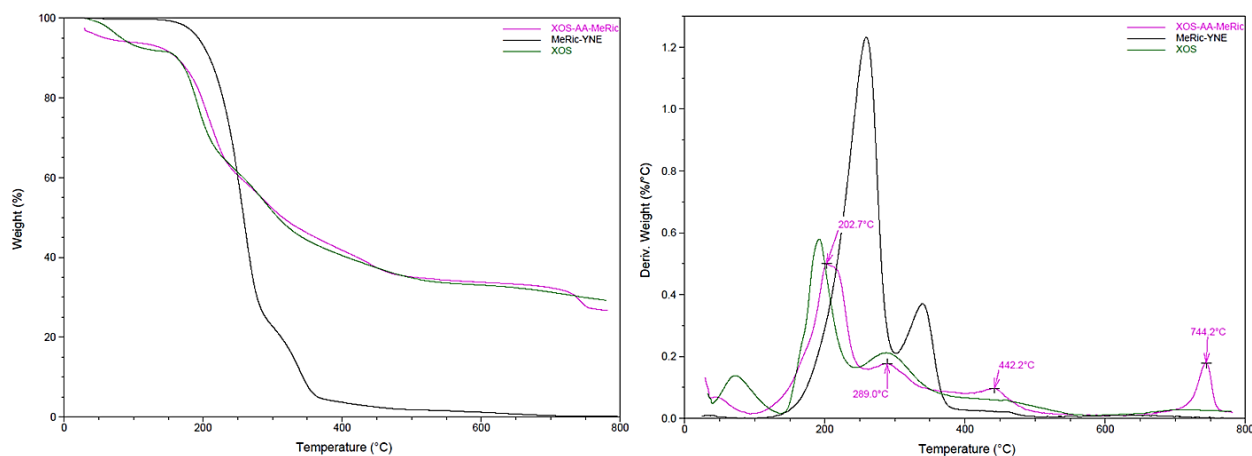


Figure 31. Analyses TGA des XOS (en vert), du BuRic (en noir) et du système XOS-Ric (en rose) réalisées de 30°C à 800°C sous azote à 10°C/min

Conclusion

Dans ce quatrième chapitre, deux modifications chimiques différentes de l'oléate et du ricinoléate de méthyle ont été réalisées. La première est l'introduction d'un groupement thiol par réaction thiol-ène avec l'éthanedithiol. Cette réaction fonctionne facilement mais engendre la synthèse de coproduits qu'il est difficile d'éliminer. La seconde est l'introduction d'un groupement alcyne par réaction de transestérification avec le 3-butyn-1-ol. La réaction est facile à mettre en place et les produits de réactions sont obtenus avec une bonne pureté.

Deux voies de couplage ont ensuite été entreprises. Tout d'abord, le couplage thiol-ène entre les MeOI et MeRic fonctionnalisés thiol et les XOS portant une fonction allyle. Malgré les efforts entrepris pour augmenter la conversion, la conversion totale n'a pu être atteinte. Néanmoins, ce couplage est facile à mettre en place et reste une voie de couplage qui devrait être facilement optimisée.

Ensuite, le couplage azoture-alcyne entre les BuOI et BuRic et les XOS fonctionnalisés par un groupement azoture a été réalisé. Malgré un rendement faible, *a priori* dû à l'étape de dialyse, les oligomères amphiphiles ont été obtenus avec une bonne pureté. Les propriétés physico-chimiques de ces derniers seront alors étudiées dans le chapitre V.

Références

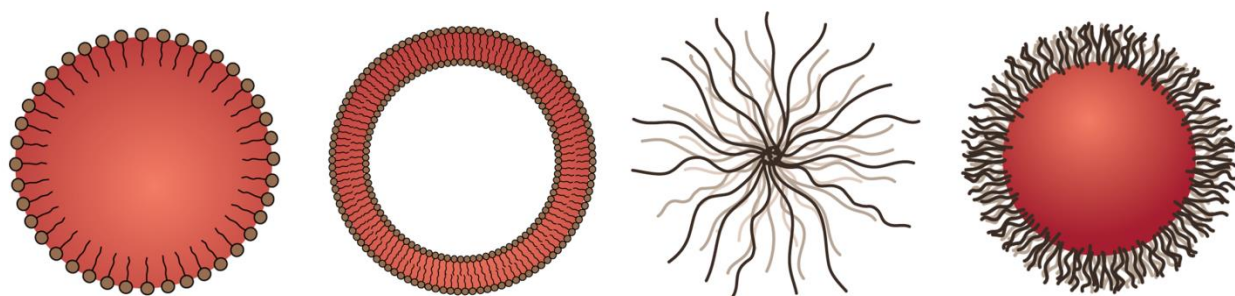
- [1] OECD/FAO. Oilseeds and oilseed products. 2013.
- [2] Gandini A. The irruption of polymers from renewable resources on the scene of macromolecular science and technology. *Green Chemistry* 2011;13:1061–83.
- [3] Montero de Espinosa L, Meier M a R. Synthesis of star- and block-copolymers using ADMET: head-to-tail selectivity during step-growth polymerization. *Chemical Communications* 2011;47:1908–10.
- [4] Meier MAR, Metzger JO, Schubert US. Plant oil renewable resources as green alternatives in polymer science. *Chemical Society Reviews* 2007;36:1788–802.
- [5] More AS, Maisonneuve L, Lebarbé T, Gadenne B, Alfos C, Cramail H. Vegetable-based building-blocks for the synthesis of thermoplastic renewable polyurethanes and polyesters. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2013;115:61–75.
- [6] Petrovic ZS. Polyurethanes from vegetable oils. *Polymer Reviews* 2008;48:109–55.
- [7] Hong J, Luo Q, Wan X, Petrović ZS, Shah BK. Biopolymers from Vegetable Oils via Catalyst- and Solvent-Free “Click” Chemistry: Effects of Cross-Linking Density. *Biomacromolecules* 2012;13:261–6.
- [8] Ogunniyi DS. Castor oil: A vital industrial raw material. *Bioresource Technology* 2006;97:1086–91.
- [9] Maisonneuve L, Lebarbé T, Grau E, Cramail H. Structure-properties relationship of fatty acid-based thermoplastics as synthetic polymer mimics. *Polymer Chemistry* 2013;4:5472–517.
- [10] Biermann U, Bornscheuer U, Meier MAR, Metzger JO, Schäfer HJ. Oils and Fats as Renewable Raw Materials in Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition* 2011;50:3854–71.
- [11] Meier MAR. Metathesis with Oleochemicals: New approaches for the utilization of plant oils as renewable resources in polymer science. *Macromolecular Chemistry and Physics* 2009;210:1073–9.
- [12] Türlüç O, Meier MAR. The Thiol-Ene (Click) Reaction for the Synthesis of Plant Oil derived Polymers. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2013;115:41–54.
- [13] Meier MAR, Türlüç OO. Fatty acid derived monomers and related polymers via thiol-ene (click) additions - SI. *Macromolecular Rapid Communications* 2010;31:1822–6.

- [14] Palaskar D V, Boyer A, Cloutet E, Le Meins J-F, Gadenne B, Alfos C, et al. Original diols from sunflower and ricin oils: Synthesis, characterization, and use as polyurethane building blocks. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 2012;50:1766–82.
- [15] Pham PD, Lapinte V, Raoul Y, Robin J-J. Lipidic polyols using thiol-ene/yne strategy for crosslinked polyurethanes. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 2014;52:1597–606.
- [16] Stemmelen M. De la fonctionnalisation d'une huile végétale aux matériaux polymères bio-sources : étude de lipopolymères en solution et de résines epoxy lipidiques. Thèse de l'Université de Montpellier 2, 2012.
- [17] Christie WW. PREPARATION OF ESTER DERIVATIVES OF FATTY ACIDS FOR CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS. In: Christie WW, editor. *Advances in Lipids Methodology*. Oily Press, Dundee: 1993, p. 69–111.
- [18] Jérôme F, Kharchafi G, Adam I, Barrault J. "One pot" and selective synthesis of monoglycerides over homogeneous and heterogeneous guanidine catalysts. *Green Chemistry* 2004;6:72–4.
- [19] Sabot C, Kumar KA, Meunier S, Mioskowski C. A convenient aminolysis of esters catalyzed by 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ene (TBD) under solvent-free conditions. *Tetrahedron Letters* 2007;48:3863–6.
- [20] Lebarbé T, Maisonneuve L, Nga Nguyen TH, Gadenne B, Alfos C, Cramail H. Methyl 10-undecenoate as a raw material for the synthesis of renewable semi-crystalline polyesters and poly(ester-amide)s. *Polymer Chemistry* 2012;3:2842–51.
- [21] Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie - International Edition* 2001;40:2004–21.
- [22] Lligadas G, Ronda JC, Galià M, Cádiz V. Monomers and polymers from plant oils via click chemistry reactions. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 2013;51:2111–24.
- [23] Upadhyay KK, Meins JF Le, Misra A, Voisin P, Bouchaud V, Ibarboure E, et al. Biomimetic Doxorubicin Loaded Polymersomes from Hyaluronan-block-Poly(γ -benzyl glutamate) Copolymers. *Biomacromolecules* 2009;10:2802–8.
- [24] Hadjichristidis N, Pispas S, Floudas G. DILUTE SOLUTIONS OF BLOCK COPOLYMERS IN SELECTIVE SOLVENTS. *Block Copolymers: Synthetic strategies, physical properties, and applications*. John Wiley, 2003, p. 203–31.
- [25] Lee SC, Huh KM, Lee J, Cho YW, Galinsky RE, Park K. Hydrotropic polymeric micelles for enhanced paclitaxel solubility: in vitro and in vivo characterization. *Biomacromolecules* 2007;8:202–8.

- [26] Zeng J, Shi K, Zhang Y, Sun X, Deng L, Guo X, et al. Synthesis of poly(N-isopropylacrylamide)-b-poly(2-vinylpyridine) block copolymers via RAFT polymerization and micellization behavior in aqueous solution. *Journal of Colloid and Interface Science* 2008;322:654–9.
- [27] Gadalla AM. Kinetics of Thermal Decomposition of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ to CuO . *International Journal of Chemical Kinetics* 1984;16:655–68.

Chapitre V

Etude physico-chimique des oligomères amphiphiles



©Michel Cloitre [1] / CNRS UMR 7167

Exemples de particules déformables (de gauche à droite): gouttelette d'émulsion, liposome, macromolécule en étoile, micelle de polymères à blocs.

Dans ce dernier chapitre, les propriétés en solution des oligomères amphiphiles obtenus par couplage azoture-alcyne, *i.e.* XOS-OI et XOS-Ric, ont été étudiées. En effet, dans le cas de systèmes à blocs de nature chimique incompatible, il existe une micro-séparation de phase en solution conduisant à la formation d'objets organisés. Grâce à cela, il est possible d'envisager des applications d'encapsulation, de tensioactifs ou encore de revêtements, pour les systèmes synthétisés au cours de ce travail de thèse.

Sommaire

Partie A.	195
Auto-assemblage des oligomères amphiphiles en solution.	195
I. Méthodologie mise en place	199
II. Etude de l'auto-assemblage des oligomères amphiphiles en solution	200
II.1. Etude dans le chloroforme	200
II.2. Etude dans l'eau	206
II.3. Discussion	211
Partie B.	213
Propriétés tensioactives des oligomères amphiphiles	213
I. Détermination de la CMC	216
II. Tension de surface air/liquide	219
III. Mouillage	221
IV. Pouvoir moussant	224
Conclusion	227
Références	228

Partie A.

Auto-assemblage des oligomères amphiphiles en solution

Un copolymère à blocs est composé d'au moins deux segments A et B liés entre eux par liaison covalente formant ainsi une macromolécule notée A-*b*-B. Lorsque ces deux blocs sont incompatibles, il existe une micro-séparation de phase. Cette séparation de phase peut être étudiée en masse ou en solution. Dans ce travail de thèse, seule la séparation de phase en solution a été étudiée.

Le type de microphase obtenue dépend :

- De la fraction volumique relative d'un bloc par rapport à l'autre, $f_A = V_A/(V_A+V_B)$. C'est un paramètre d'ordre géométrique,
- Des forces d'interactions attractives et répulsives entre les deux blocs (et le solvant lors d'une étude en solution). C'est un paramètre d'ordre énergétique et entropique. Cette tension interfaciale est décrite par le produit χN , où
 χ est le paramètre d'interaction de Flory-Huggins, relatif à l'enthalpie du système, quantifiant le degré d'immiscibilité, et
 N est de degré de polymérisation, contribuant à l'entropie du système.

L'incompatibilité des deux blocs se traduit également en terme de miscibilité. Il existe alors des solvants sélectifs dans lesquels l'un des deux blocs est soluble et l'autre ne l'est pas. Lorsque le solvant est l'eau, l'un des blocs est hydrophile et l'autre hydrophobe, le copolymère est alors amphiphile. Au-delà de la concentration micellaire critique (**CMC**) et au-delà de la température micellaire critique (**CMT**), l'enthalpie liée au contact entre les blocs solvophobes et le solvant devient trop élevée : il y a séparation de phase. Les blocs solvophobes s'agrègent afin de minimiser le contact avec le solvant. Les molécules de solvants initialement 'organisées' au voisinage des segments solvophobes sont alors libérées, augmentant ainsi l'entropie du système. Cette organisation est néanmoins contrebalancée par l'étirement des chaînes agrégées induit par leur agrégation, et par la répulsion entre les chaînes solvophiles qui cherchent un contact maximal avec le solvant.

L'auto-assemblage en solution est donc un équilibre régi par la thermodynamique [2,3]:

- la tension interfaciale entre le cœur de l'objet (formé des chaînes solvophobes) et le solvant,
- les interactions répulsives entre les chaînes solvophiles de la couronne,
- le degré d'étirement imposé aux chaînes formant le cœur de l'objet.

Des données expérimentales sur l'auto-assemblage de copolymères à blocs dans l'eau montrent que ce phénomène serait gouverné par l'entropie du système. *A contrario*, l'auto-assemblage de copolymères à blocs en solvant organique serait gouverné par la contribution enthalpique [4].

Cet équilibre impose donc aux objets formés une certaine morphologie, ainsi qu'une certaine dimension. Les morphologies peuvent alors varier selon : la composition du copolymère, sa concentration, la nature du solvant ou par la présence d'additifs tel que des sels qui vont influencer l'équilibre thermodynamique [3]. La Figure 1 illustre les trois morphologies principalement observées lors de l'auto-assemblage d'un copolymère à blocs amphiphile dans l'eau. Cette organisation de plusieurs molécules en objets est généralement nommée micellisation indépendamment de la structure formée. Au-delà d'une certaine concentration en copolymère, dite concentration de gélification critique (**CGC**), les objets s'organisent les uns par rapport aux autres afin de minimiser l'énergie du système, soit par un phénomène d'association (objet à l'équilibre) soit d'agrégation [5] : il y a formation de clusters de micelles.

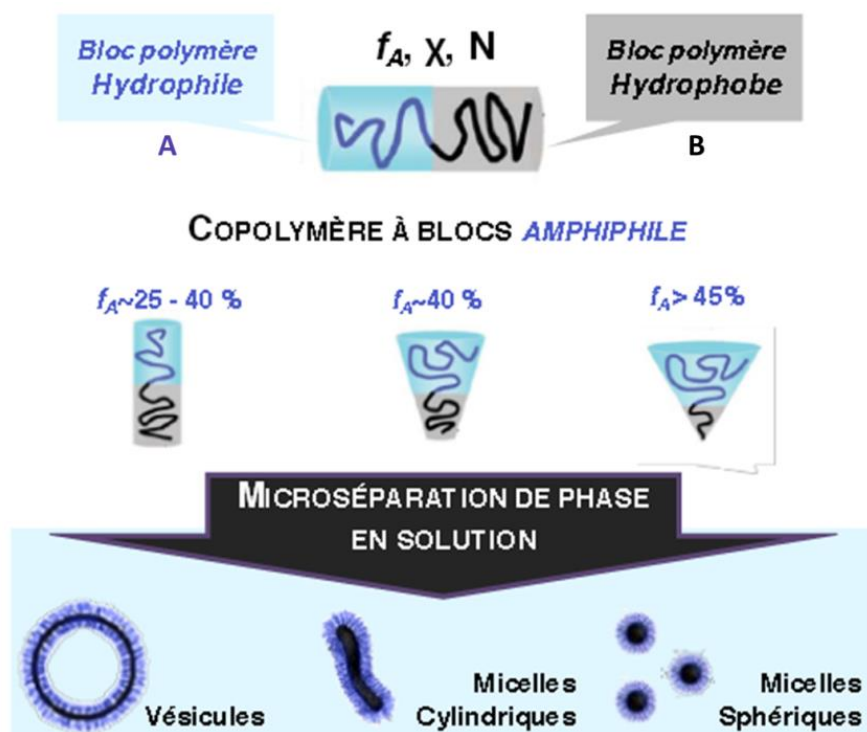


Figure 1. Représentation schématique de l'auto-assemblage d'un copolymère à blocs avec f_A la fraction volumique du bloc hydrophile. Drappier (2013), adapté de Mai et Eisenberg (2012) [3,6]

Des outils de prédiction de l'auto-assemblage des copolymères à blocs flexibles ont été largement développés et sont très bien explicités dans de nombreuses revues [2–5,7–9]. Néanmoins, ces modèles basés sur des considérations géométriques ne s'appliquent que pour des polymères flexibles. Ces outils atteignent donc leurs limites dans le cas de copolymères rigides-flexibles, ce qui est le cas dans ce travail de thèse avec le bloc XOS rigide. En général, l'alignement compact des blocs rigides favorise des phases lamellaires et conduit à la formation de micelles cylindriques et de vésicules [10,11].

Différentes techniques complémentaires peuvent être utilisées pour la caractérisation de ces auto-assemblages, parmi elles [4]:

- La **SLS** (diffusion statique de la lumière) renseigne sur la masse molaire moyenne en masse des micelles qui permet de déterminer le nombre d'agrégation, c'est-à-dire le nombre de chaînes de copolymère par micelle. Le rayon de giration (R_g) peut aussi être déterminé à condition que la diffusion du cœur de l'objet ne soit pas très différente de

celle de la couronne. Cette technique est très sensible et peut aussi être utilisée pour déterminer la CMC (ou la CMT).

- La **DLS** (diffusion dynamique de la lumière) permet d'obtenir le rayon hydrodynamique (R_h) des objets formés en solution par mesure de leur coefficient de diffusion. Dans le cas d'objets sphériques, ce rayon est considéré comme reflétant la taille réelle des objets. Grâce à l'analyse des mesures d'intensité de diffusion, des données sur la distribution en taille des objets ainsi que le nombre relatif de chaque population peuvent être calculées. Combinée à la SLS, la DLS permet d'identifier la forme des objets : sphérique ou bâtonnet à travers l'expression du rapport R_g/R_h . Néanmoins, l'intensité diffusée est proportionnelle à la taille de l'objet à la puissance 6 (une particule de 1 μm diffuse la même intensité que 10^{12} particules de 10 nm), il est donc très difficile de voir les petits objets en présence soit de gros objets soit d'agrégats.
- La **SAXS** (diffusion des rayons X aux petits angles) peut aussi être utilisée pour déterminer la masse molaire, la taille globale mais aussi la structure interne des micelles. Grâce au principe basé sur une différence de densité électronique entre les blocs, les dimensions du cœur ainsi que de la couronne peuvent être déterminées. En solution concentrée, il est aussi possible d'accéder à des informations sur les interactions intermicellaires.
- La **SANS** (diffusion des neutrons aux petits angles) permet également d'accéder à des informations concernant la structure interne des micelles en particulier si l'un des deux blocs est deutéré. C'est une technique très similaire à la SAXS et les analyses effectuées par SLS peuvent aussi être réalisées par SANS, avec une meilleure résolution.
- La **TEM** (microscopie à transmission électronique) vient en complément des analyses en diffusion pour renseigner sur la taille, la forme, la distribution des tailles ainsi que sur la structure interne des objets. En TEM classique, l'échantillon est déposé sur la grille et le solvant laissé évaporé : les micelles sont alors 'sèches', dans un état 'collapsé' à deux dimensions reflétant les micelles en solution alors en 3 dimensions. Il est aussi possible de faire de la cryo-TEM. Dans ce cas, la solution est rapidement gelée pour éviter la cristallisation de l'eau et observée à basse température.

Notons que d'autres type de microscopie peuvent être utilisés tels que la microscopie confocale ou encore la microscopie à force atomique.

I. Méthodologie mise en place

Les deux oligomères amphiphiles, XOS-OI et XOS-Ric, dont la synthèse est décrite dans la partie B.II du chapitre IV ont montré une aptitude à s'associer en objets supramoléculaires lors de leurs analyses RMN ^1H , à la fois dans CDCl_3 et dans D_2O . Ces derniers ont donc été mis en solution à la fois dans le chloroforme et dans l'eau afin d'étudier la nature de leurs assemblages.

Les oligomères amphiphiles sont-ils solubles, organisés ou précipités ?

Afin de répondre à cette question, une méthodologie faisant appel à des analyses en DLS et par TEM a été mise au point. Elle sera identique pour les deux solvants utilisés, *i.e.* chloroforme et eau.

Premièrement, les solutions des oligomères amphiphiles ont été préparées par deux méthodes différentes (dissolution directe ou dilution à partir d'une solution mère concentrée) pour étudier la dynamique de ces systèmes. En effet, lorsque la thermodynamique contrôle l'auto-assemblage, les structures obtenues sont indépendantes du mode de préparation et les objets sont en équilibre dynamique avec les unimères. À l'inverse, les objets peuvent être figés dans une certaine structure qui a de fortes probabilités d'être différente selon le mode de préparation.

Ensuite, des solutions de concentrations différentes (0,1 ; 1 et 10 g/L) ont été préparées et analysées par DLS (après un temps de mise en solution minimum de 48h) pour étudier l'influence de la concentration sur la taille des objets.

Enfin, la solution à 1 g/L a été filtrée à 0,45 μm pour éliminer les gros objets dont le signal en diffusion 'écrase' celui des petits objets ($I \propto d^6$). Des analyses en DLS ont alors été effectuées à la suite de la filtration. Les solutions à 1 g/L, avant et après filtration, ont également été analysées par TEM.

II. Etude de l'auto-assemblage des oligomères amphiphiles en solution

II.1. Etude dans le chloroforme

La Figure 2 pour XOS-OI et la Figure 3 pour XOS-Ric montrent les résultats obtenus par DLS. En A et A' sont représentés les corrélogrammes et les distributions des tailles des solutions préparées par dissolution directe. En B et B' sont représentés les corrélogrammes et les distributions des tailles des solutions préparées par dilution de la solution mère à 10 g/L.

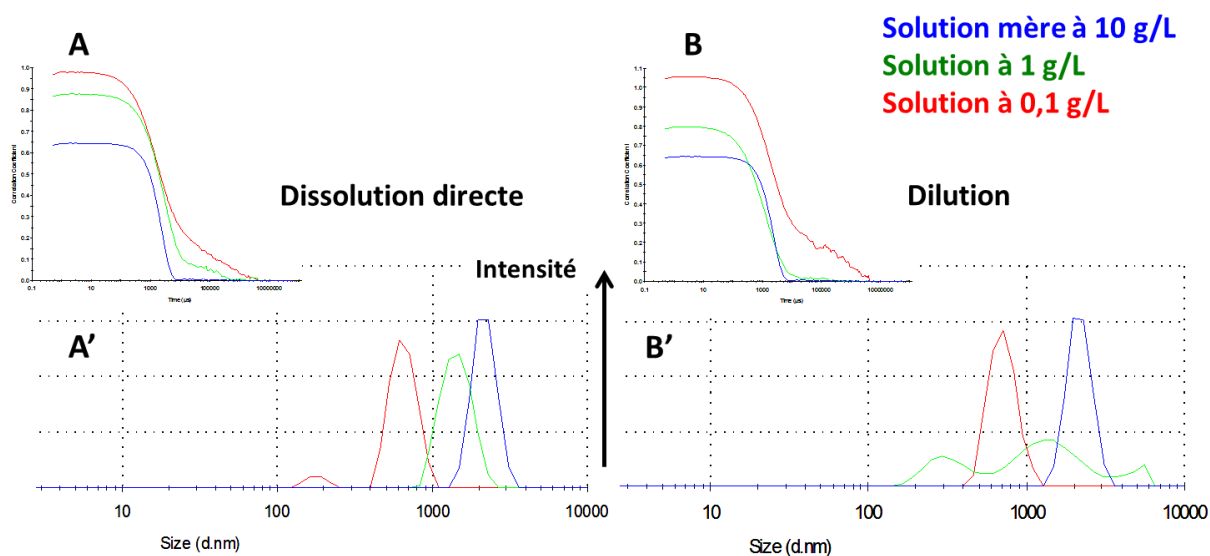


Figure 2. Analyses en DLS du système XOS-OI en solution dans le chloroforme à différentes concentrations (10 g/L en bleu, 1 g/L en vert et 0,1 g/L en rouge) et préparé soit par dissolution directe (corrélogramme en A et taille en fonction de l'intensité du signal en A') soit par dilution de la solution mère à 10 g/L (corrélogramme en B et taille en fonction de l'intensité du signal en B')

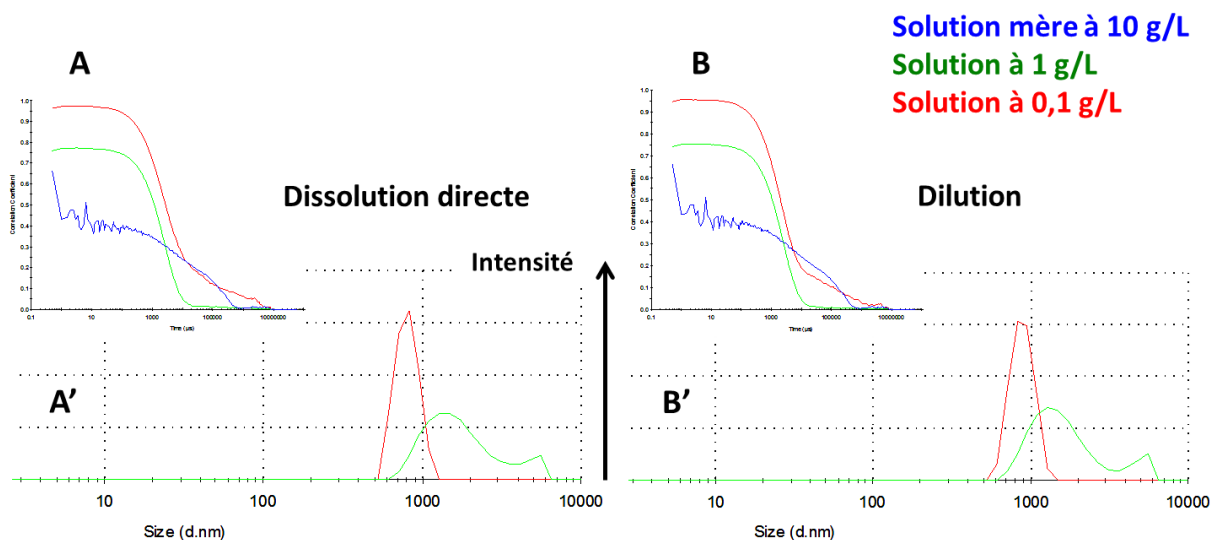


Figure 3. Analyses en DLS du système XOS-Ric en solution dans le chloroforme à différentes concentrations (10 g/L en bleu, 1 g/L en vert et 0,1 g/L en rouge) et préparé soit par dissolution directe (corrélogramme en A et taille en fonction de l'intensité du signal en A') soit par dilution de la solution mère à 10 g/L (corrélogramme en B et taille en fonction de l'intensité du signal en B')

Ces résultats montrent que, pour les deux systèmes étudiés, les mêmes populations sont observées que les solutions soient préparées par dissolution directe ou par dilution (exemple du XOS-OI illustré par TEM en Figure 4 avec en A la solution à 1 g/L préparée par dissolution directe et en B celle préparée par dilution), indiquant que ces structures sont à l'équilibre. Cet équilibre peut s'expliquer par la flexibilité et la mobilité de la chaîne grasse, grâce à sa faible taille et à sa bonne miscibilité dans le chloroforme.

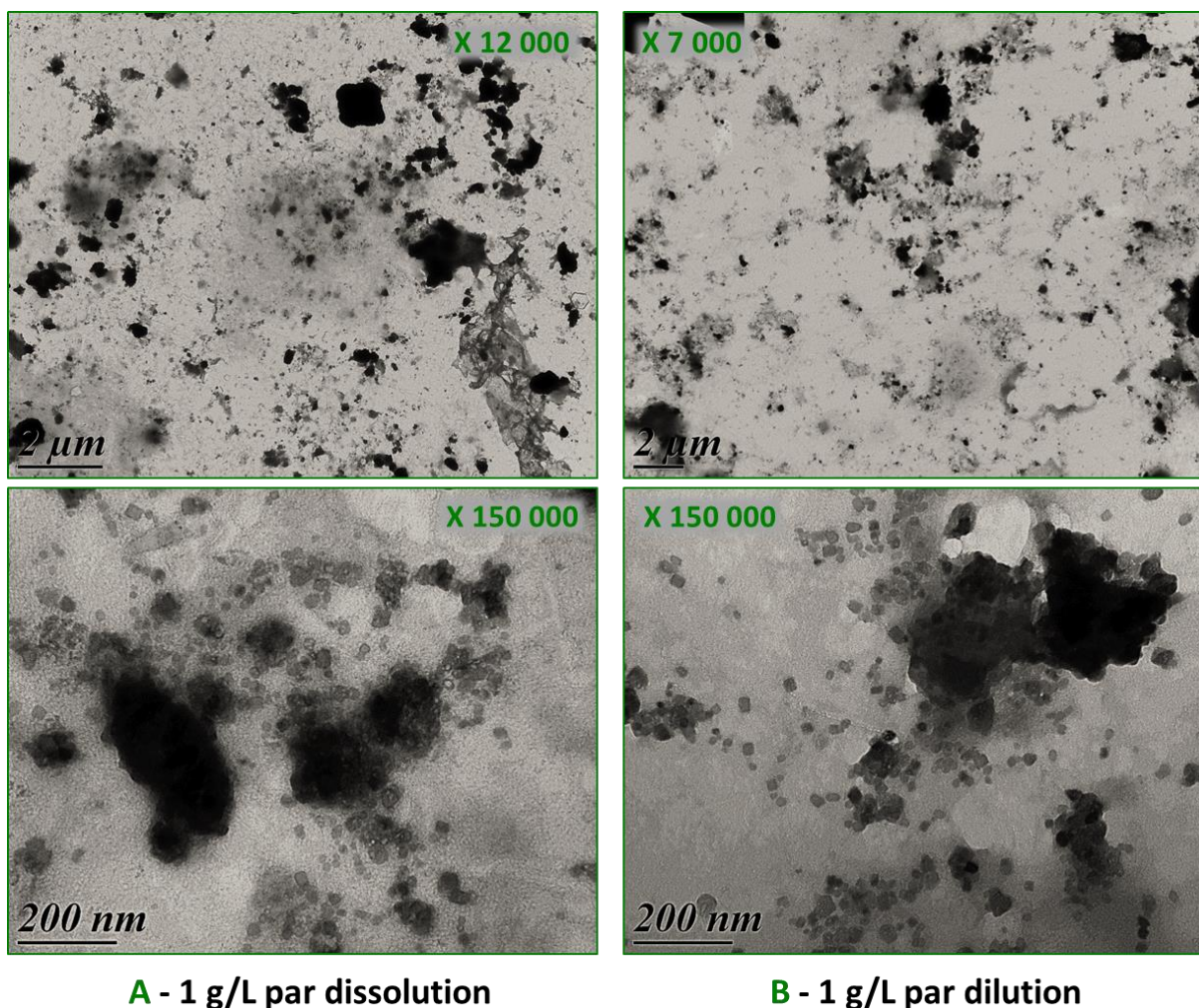


Figure 4. Images obtenues par TEM du système XOS-OI en solution dans le chloroforme à 1 g/L préparé soit par dissolution directe (A) soit par dilution de la solution mère à 10 g/L (B)

XOS-OI

Pour le système avec le segment 'oléate' (Figure 2), les résultats des analyses en DLS montrent des objets de tailles très supérieures à 50 nm qui ne correspondent pas du tout à des tailles de micelles, il y a vraisemblablement formation d'agrégats. L'imagerie par TEM (Figure 4) révèle en fait la présence de petits objets non sphériques de taille micellaire ($d \leq 50$ nm) et certains de ces objets sont regroupés en agrégats. Bien que les micelles soient plus nombreuses que les agrégats, la taille en diffusion reflètera toujours davantage celle des agrégats ($I \propto d^6$).

Les analyses en DLS montrent également que la taille des agrégats augmente de façon significative avec la concentration. Les agrégats ont une taille d'environ 700 nm à 0,1 g/L qui augmente à 1500 nm à 1 g/L, puis à 2500 nm à 10 g/L. Plus la concentration augmente, plus la

quantité de micelles augmente et plus celles-ci ont la possibilité de s'agréger. Néanmoins, avec ces seules données il est difficile de conclure sur l'origine de cette agrégation. Celle-ci n'est *a priori* pas gouvernée par la chaîne grasse qui ne contient aucun groupement propice à la création d'interactions entre les différentes micelles. Cette agrégation serait due à une exposition du bloc XOS vers l'extérieur des micelles qui permettrait alors d'établir des interactions entre micelles.

XOS-Ric

De la même manière que pour le système précédent, les agrégats sont en équilibre dynamique mais leurs tailles sont un peu plus importantes et les oligomères amphiphiles s'agrégent complètement à 10 g/L (Figure 3-A et B). Après dilution à 1 g/L, l'analyse devient possible : les associations régissant l'assemblage de ces 'gros' objets sont donc assez faibles pour être défaits par simple dilution. Cette différence entre les deux systèmes peut être expliquée par la présence du groupement hydroxyle sur le segment ricinoléate. En effet, les objets formés dans le chloroforme ont leur couronne composée des chaînes grasses, de fait, les groupements hydroxyle seront présents à la surface des objets. En raison de sa faible constante diélectrique, le chloroforme est un solvant propice à la formation de liaisons hydrogène entre molécules. Les objets avec les hydroxyles en surface vont alors interagir entre eux par liaisons hydrogène. Plus la concentration augmente, plus la proximité des objets entre eux favorise la formation de ces 'gros' objets et rend l'analyse DLS impossible.

Cette première partie de l'étude a permis de montrer que les deux systèmes s'auto-assemblent dans le chloroforme à 1 et 0,1 g/L pour former des objets de l'ordre du micron. Ces objets sont alors régis par des associations assez faibles pour être observés quelle que soit la méthode de préparation des solutions. Ces objets sont donc en équilibre dynamique. L'imagerie par TEM (Figure 4) montre que des objets de taille micellaire sont également formés et qu'ils s'agrégent jusqu'à former de 'gros' objets visibles en DLS.

Pour étudier plus en détail ce phénomène, les solutions à 1 g/L ont été filtrées puis analysées par DLS et TEM. La Figure 5 pour XOS-OI et la Figure 6 pour XOS-Ric montrent les résultats des

analyses en DLS (en I pour la distribution des tailles en intensité et en N pour la distribution en nombre) ainsi que les images obtenues par TEM (en D pour les solutions faites par dilution et non filtrées et en F après filtration).

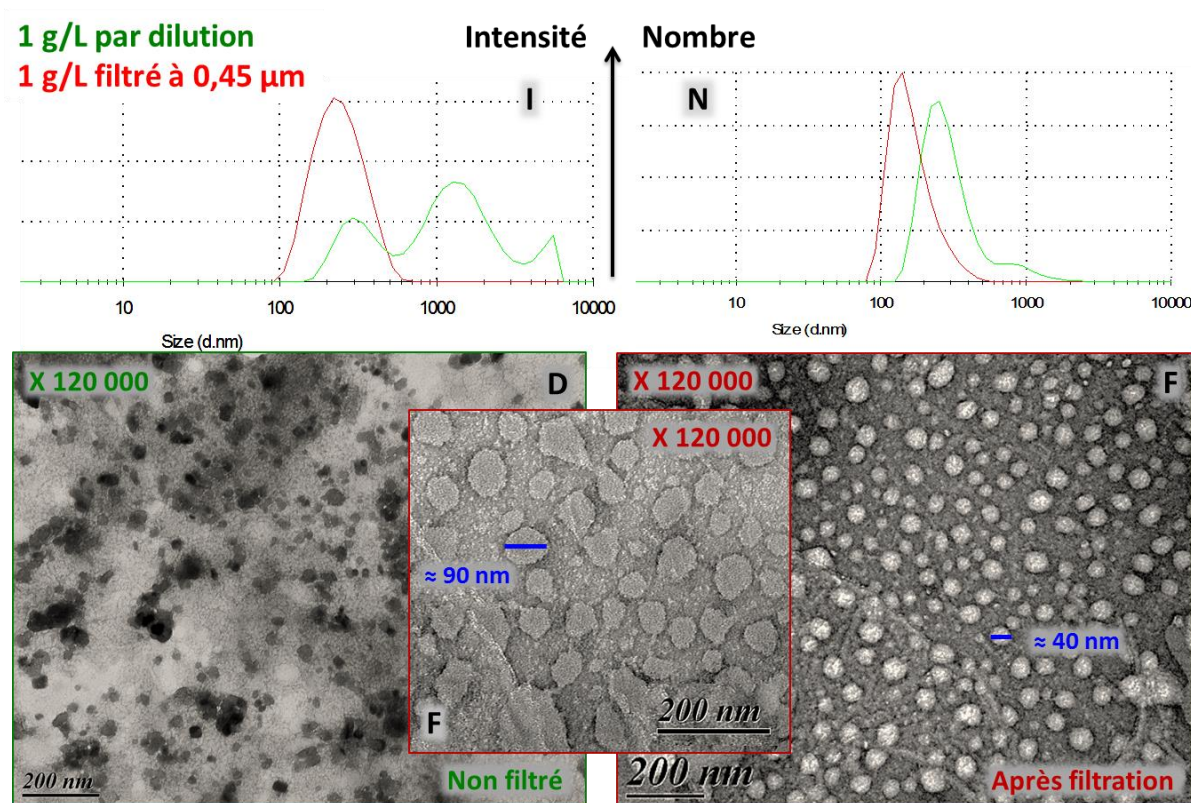


Figure 5. Analyses en DLS du système XOS-OI à 1 g/L dans le chloroforme avant (vert) et après (rouge) filtration à 0,45 μm avec la distribution en intensité (I) et en nombre (N) ; Images obtenues par TEM du système XOS-OI à 1 g/L dans le chloroforme avant (D) après (F) filtration à 0,45 μm

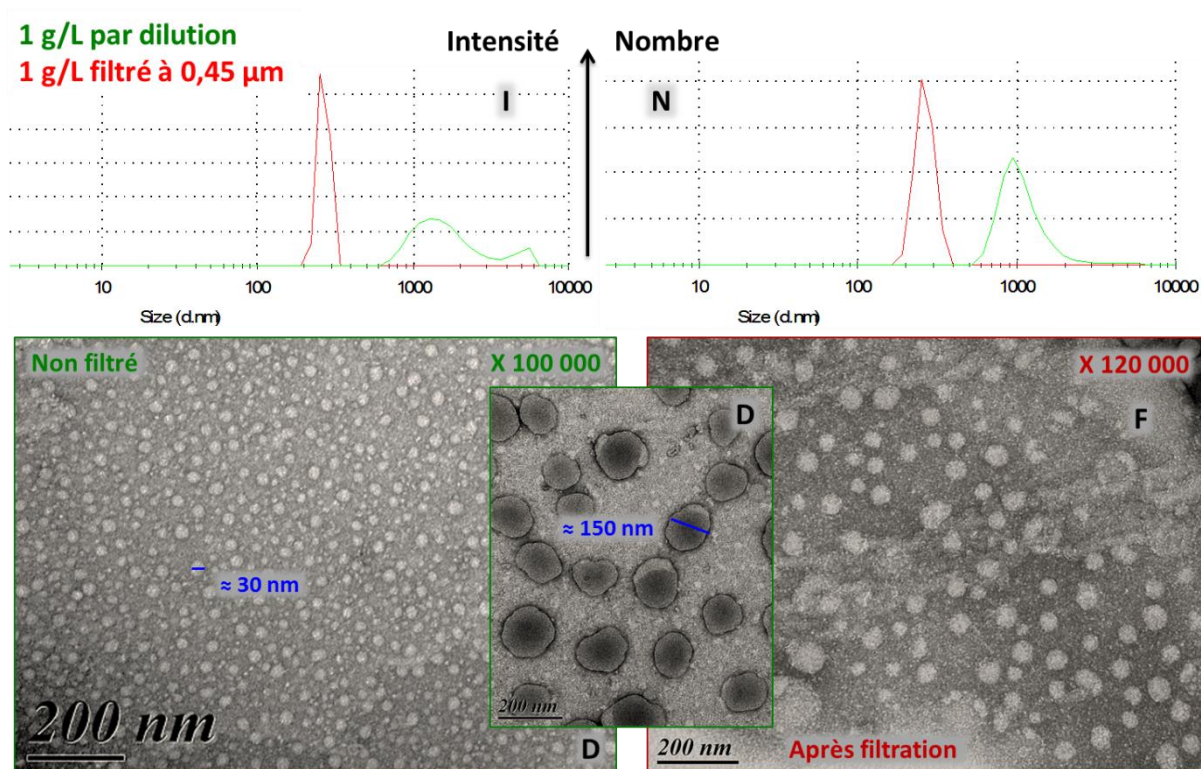


Figure 6. Analyses en DLS du système XOS-Ric à 1g/L dans le chloroforme avant (en vert) et après (en rouge) filtration à 0,45 μm avec la distribution en intensité (I) et en nombre (N) ; Images obtenues par TEM du système XOS-Ric à 1 g/L dans le chloroforme avant (D) après (F) filtration à 0,45 μm

Pour les deux systèmes étudiés, les résultats DLS (Figure 5-I et N pour XOS-OI et Figure 6-I et N pour XOS-Ric) montrent que la filtration permet d'éliminer la population de taille supérieure au micron et des objets dont la taille est d'environ 250 nm apparaissent alors nettement.

XOS-OI

Pour le système avec le segment 'oléate', l'imagerie par TEM montre une différence flagrante entre les objets avant et après filtration (Figure 5-D et F). Les objets non sphériques de taille micellaire agrégés en 'paquets' avant filtration deviennent, après filtration, un 'tapis' d'objets sphériques assez bien définis de tailles comprises entre 40 et 90 nm. Les objets non sphériques d'avant filtration ne seraient pas des micelles mais des objets de structures moins bien définies. Ces structures pourraient s'expliquer par le fait que le bloc XOS génère des interactions avec les autres blocs XOS. Ce qui explique aussi pourquoi ils s'agrègent entre eux. Il n'est pas à exclure que la filtration ait aussi eu un effet de cisaillement permettant d'expliquer ce changement de morphologie.

XOS-Ric

Pour le système avec le segment 'ricinoléate', l'imagerie par TEM ne montre aucune différence entre les objets observés avant et après filtration (Figure-6 D et F). Les objets sont sphériques avec une taille micellaire d'environ 30 nm. Avant filtration, la TEM révèle, à certains endroits de la grille, la présence d'objets d'environ 150 nm qui pourraient correspondre aux objets observés en DLS (Figure 6). Néanmoins, ces objets ne sont plus observés par TEM après filtration. Ils doivent donc être peu nombreux mais leur grande taille permet une diffusion assez intense en DLS pour 'écraser' le signal de diffusion des objets micellaires.

II.2. Etude dans l'eau

Les Figure 7 pour XOS-OI et Figure 8 pour XOS-Ric montrent les résultats obtenus par DLS. En A et A' sont représentés les corrélogrammes et les distributions des tailles des solutions préparées par dissolution directe. En B et B' sont représentés les corrélogrammes et les distributions des tailles des solutions préparées par dilution de la solution mère à 10 g/L.

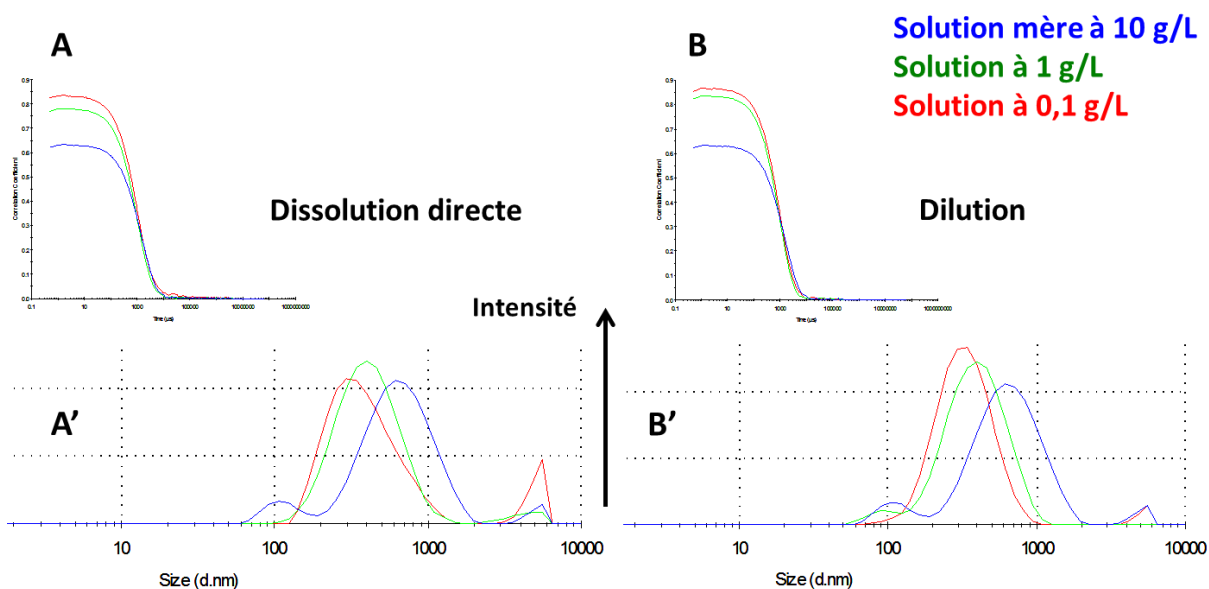


Figure 7. Analyses en DLS du système XOS-OI en solution dans l'eau à différentes concentrations (10 g/L en bleu, 1 g/L en vert et 0,1 g/L en rouge) et préparé soit par dissolution directe (corrélogramme en A et taille en fonction de l'intensité du signal en A') soit par dilution de la solution mère à 10 g/L (corrélogramme en B et taille en fonction de l'intensité du signal en B')

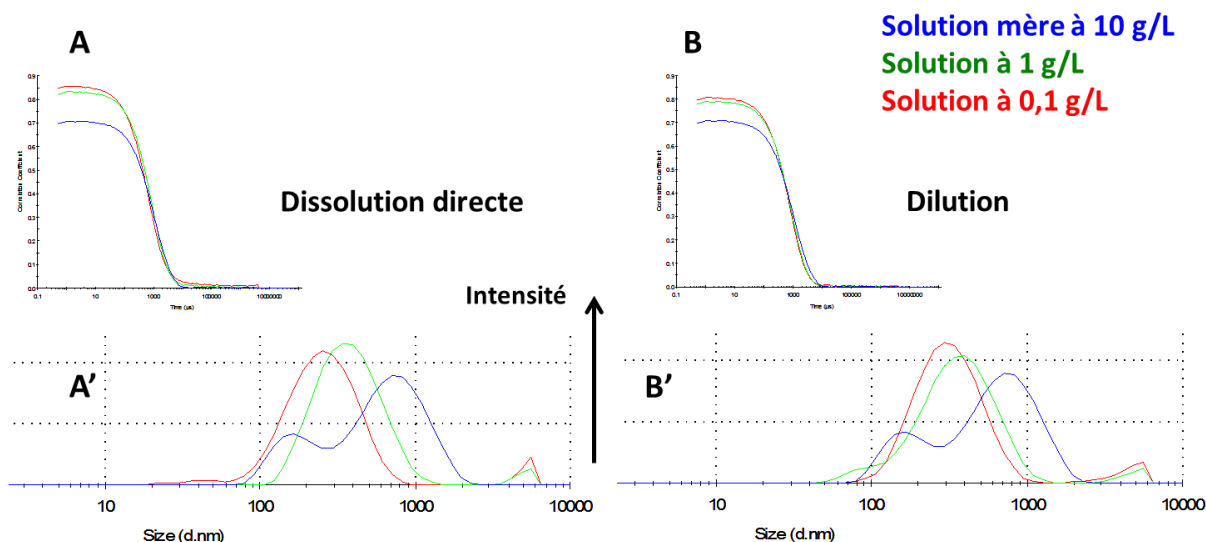


Figure 8. Analyses en DLS du système XOS-Ric en solution dans l'eau à différentes concentrations (10 g/L en bleu, 1 g/L en vert et 0,1 g/L en rouge) et préparé soit par dissolution directe (corrélogramme en A et taille en fonction de l'intensité du signal en A') soit par dilution de la solution mère à 10 g/L (corrélogramme en B et taille en fonction de l'intensité du signal en B')

Ces résultats montrent que, pour les deux systèmes étudiés, quelle que soit la méthode de préparation des solutions à 0,1 g/L et à 1g/L, les objets présentent des distributions de tailles très similaires. Comme dans le chloroforme, il apparaît que la taille des objets augmente avec la concentration. Ils ont une taille d'environ 250 nm à 0,1 g/L, de 400 nm à 1 g/L et de 800 nm à 10 g/L.

Par ailleurs, pour la concentration à 10 g/L (en bleu), une population d'objets à environ 100 nm est également observée pour les deux systèmes. L'imagerie par TEM (XOS-Ric en exemple sur la Figure 9, avec en A la solution à 1 g/L préparée par dissolution directe et en B celle préparée par dilution) confirme la coexistence de plusieurs populations en solution quel que soit le mode de préparation : la présence de 'gros' objets à 750 nm, celle d'objets 'moyens' à 200 nm et la présence d'objets sphériques de taille micellaire à 20 nm. Ces derniers sont petits et leur signal en diffusion est « écrasé » par celui des plus gros objets qui eux sont confondus sous un même signal (signal vert pour les solutions à 1 g/L).

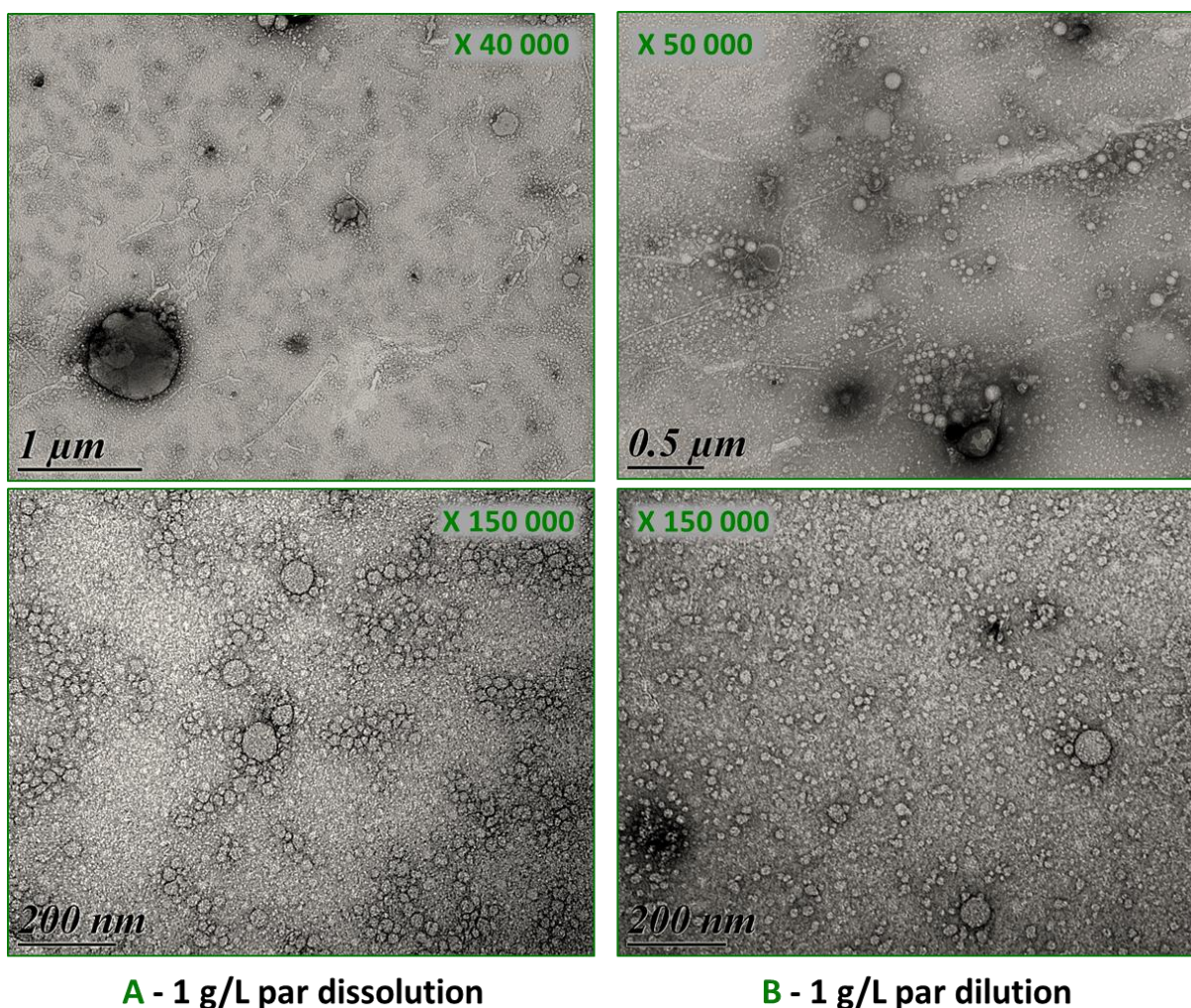


Figure 9. Images obtenues par TEM du système XOS-Ric en solution dans l'eau à 1 g/L préparé soit par dissolution directe (A) soit par dilution de la solution mère à 10 g/L (B)

Cette partie de l'étude dans l'eau a permis de montrer que les deux systèmes s'auto-assemblent dans l'eau à 10, 1 et 0,1 g/L pour former des objets entre 0,1 et 1 μm . Ces objets sont alors régis par des associations assez faibles pour être observés quelle que soit la méthode de préparation des solutions. Ces objets sont donc en équilibre dynamique. L'imagerie par TEM (Figure 9) montre que des objets de taille micellaire sont également formés.

Pour étudier plus en détail ce phénomène, les solutions à 1 g/L d'oligomères à segment 'oléate' et 'ricinoléate' ont été filtrées puis analysées par DLS et TEM. La Figure 10 pour XOS-OI et la Figure 11 pour XOS-Ric montrent les résultats des analyses en DLS (en I pour la distribution des tailles en intensité et en N pour la distribution en nombre) ainsi que les images obtenues par TEM (en D pour les solutions faites par dilution et non filtrées et en F après filtration).

Pour les deux systèmes étudiés, la filtration permet de laisser apparaître le signal en diffusion des objets micellaires d'environ 35 nm (Figure 10-N pour XOS-OI et Figure 11-N pour XOS-Ric).

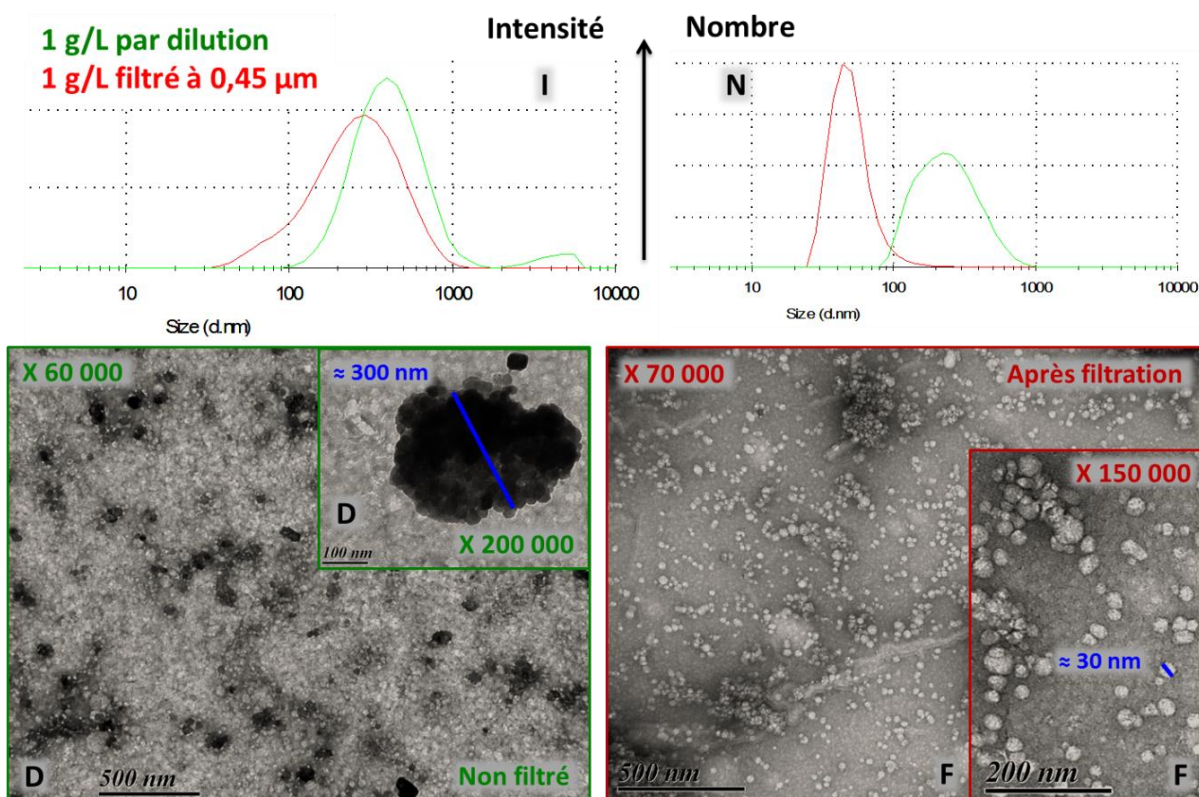


Figure 10. Analyses en DLS du système XOS-OI à 1 g/L dans l'eau avant (en vert) et après (en rouge) filtration à 0,45 μm avec la distribution en intensité (I) et en nombre (N) ; Images obtenues par TEM du système XOS-OI à 1 g/L dans l'eau avant (D) après (F) filtration à 0,45 μm

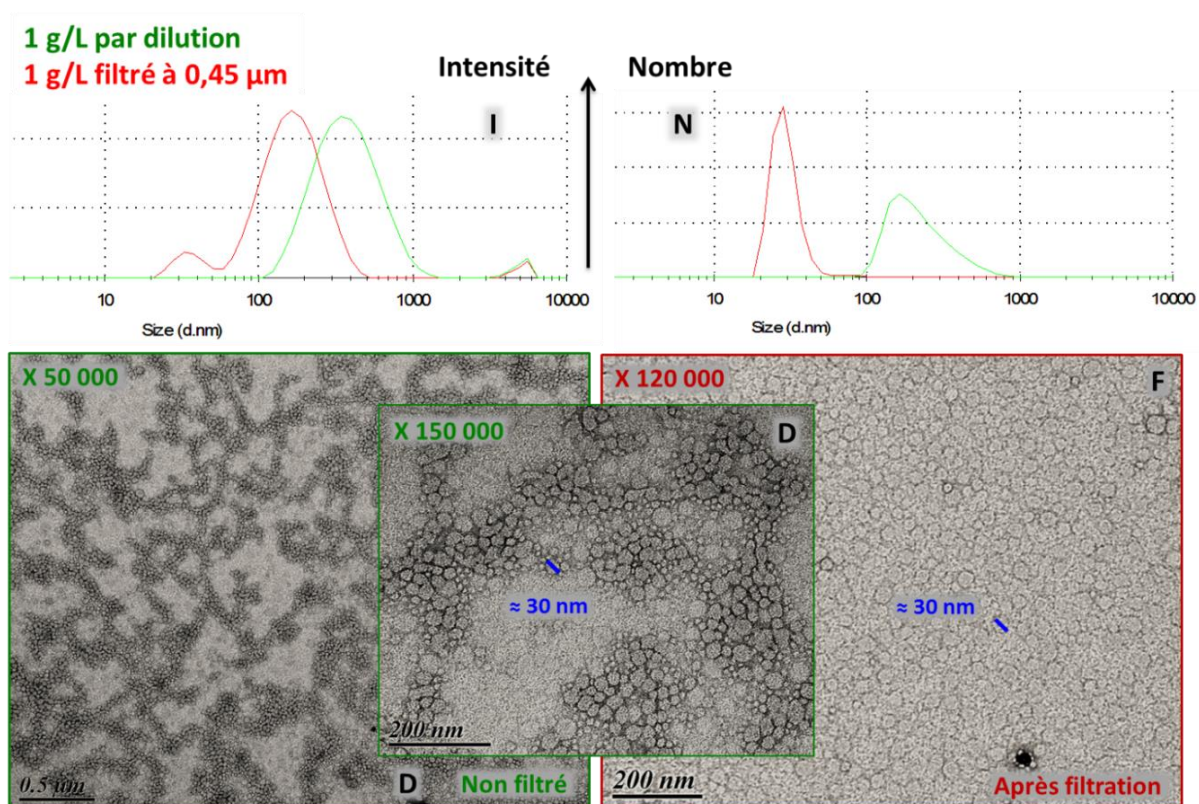


Figure 11. Analyses en DLS du système XOS-Ric à 1 g/L dans l'eau avant (en vert) et après (en rouge) filtration à 0,45 μm avec la distribution en intensité (I) et en nombre (N) ; Images obtenues par TEM du système XOS-Ric à 1 g/L dans l'eau avant (D) après (F) filtration à 0,45 μm

XOS-OI

Pour le système avec le segment 'oléate', il est difficile de discerner par TEM les objets micellaires avant filtration (Figure 10-D). Présents en grands nombres, ils forment un épais tapis. Il est néanmoins possible de voir la présence d'agrégats dont la taille d'environ 300 nm correspond au signal observé en DLS pour les objets 'moyens'. Après filtration, les images TEM montrent nettement les objets sphériques d'environ 30 nm (Figure 10-F) et ceux d'environ 300 nm ne sont plus observés.

XOS-Ric

Pour le système avec le segment 'ricinoléate', que ce soit avant ou après filtration, l'imagerie par TEM révèle la présence d'objets sphériques d'environ 30 nm. L'échantillon semble néanmoins plus homogène après filtration. Les objets d'environ 300 nm ne sont que très rarement observés par TEM, ils doivent donc être peu nombreux. Les micelles sont donc

beaucoup mieux définies dans le cas des XOS-Ric. Il est d'ailleurs étonnant que l'analyse en diffusion de ce système ne soit pas meilleure.

Finalement, les deux systèmes étudiés en solution dans l'eau conduisent à la formation d'objets de taille micellaire qui peuvent s'associer en objets plus gros par des interactions assez faibles pour que le système soit en équilibre dynamique. Il y a coexistence de structures multi-échelle. Il apparaît néanmoins que dans le cas du système avec le segment 'ricinoléate' les associations de micelles se font plus rares que dans le cas du système avec le segment 'oléate'.

II.3. Discussion

Les deux systèmes, obtenus par couplage des XOS soit avec un segment 'oléate' (XOS-OI) soit avec un segment 'ricinoléate' (XOS-Ric), peuvent s'auto-assembler aussi bien dans le chloroforme que dans l'eau. Quel que soit le solvant, leurs assemblages présentent de grandes similitudes : des objets de tailles micellaires ($d \approx 50$ nm) sont formés. A la différence près que dans l'eau, il y a formation de micelles directes (cœur hydrophobe formé des chaînes grasses et couronne hydrophile formée des XOS) et que dans le chloroforme, il y a formation de micelles inverses. Ces objets vont s'associer entre eux pour former des agrégats dont la taille varie avec la concentration (Tableau 1). Ces agrégats sont régis par des associations assez faibles pour être en équilibre dynamique puisque les mêmes objets sont obtenus quelle que soit la méthode de préparation des solutions utilisées : dissolution directe ou dilution. L'agrégation est néanmoins moins marquée dans l'eau car il existe moins d'interaction entre les différents objets : ce sont les XOS, très solubles dans l'eau, qui sont à la surface des objets. Les systèmes sont alors plus proches de leur état d'équilibre.

Tableau 1. Récapitulatif des tailles obtenues par DLS des agrégats ('gros' objets) formés à différentes concentrations dans le chloroforme et dans l'eau

Concentration (g/L)	Chloroforme	Eau
	Taille par DLS (nm)	
10	2500	800
1	1500	400
0,1	700	250

Dans les deux solvants, les micelles coexistent avec des agrégats de micelles. Deux possibilités existent pour expliquer ce phénomène [3]:

- Cette coexistence relève d'un réel phénomène thermodynamique et les différentes morphologies observées se forment en fonction des différences d'énergie libre entre elles.
- Cette coexistence reflète la dispersité de longueurs d'un des deux blocs, ici les XOS. La présence d'oligomères amphiphiles ayant le bloc XOS de longueurs de chaînes différentes génère différentes morphologies dans une même solution.

De plus, dans le chloroforme, une différence de comportement est observée entre les XOS-OI et les XOS-Ric, en raison du groupement hydroxyle présent uniquement sur le segment 'ricinoléate'. Or, dans l'eau, aucune différence de comportement entre les deux systèmes n'est observée puisque ce groupement hydroxyle est alors dans le cœur des objets et il ne 's'exprime' pas.

Partie B.

Propriétés tensioactives des oligomères amphiphiles

Dans la partie A, il a été montré que les oligomères amphiphiles synthétisés lors de ce travail de thèse s'organisent dans l'eau pour former des objets micellaires sphériques de diamètre inférieur à 50 nm. Leurs propriétés tensioactives ont alors été étudiées.

Les tensioactifs sont des composés amphiphiles de tailles variables, définis par leur capacité à diminuer les tensions interfaciales. Les deux propriétés importantes des tensioactifs sont [12,13]:

- Leur capacité d'adsorption aux interfaces (air/liquide, liquide/liquide, solide/liquide, *etc.*) qui détermine notamment leurs propriétés de mouillage et de dispersion (émulsions, suspensions ou mousses). Les tensioactifs ont tendance à s'orienter et à se concentrer aux interfaces afin d'accroître les interactions attractives (partie hydrophile/eau, partie hydrophobe/solvant organique). Or, le phénomène d'adsorption conduit à la diminution de la tension interfaciale. Par conséquent, l'énergie à apporter pour augmenter l'aire de l'interface est plus faible donc la dispersion est favorisée. De même, la tension interfaciale entre un solide et un liquide est diminuée, l'étalement du liquide est favorisée d'où la propriété de mouillage.
- Leur capacité à former des micelles à partir d'une certaine concentration, la CMC. Au-delà de la CMC, l'interface liquide/air (solide/liquide, *etc.*) est saturée ; les molécules de tensioactif en excès ont alors tendance à s'auto-assembler en micelles. Selon la polarité du solvant, les chaînes hydrophobes se retrouvent soit au cœur de la micelle, solvant polaire, soit au contact du solvant s'il est apolaire : les unimères et les micelles sont alors en équilibre dynamique.

À la CMC, un changement de comportement du tensioactif est très souvent observé : la tension superficielle diminue très fortement [12,14] et le pouvoir moussant augmente [15]. Plusieurs méthodes existent pour déterminer la CMC, parmi elles la fluorimétrie et la méthode de la goutte pendante.

La CMC est donc un paramètre important à déterminer pour caractériser les tensioactifs, l'autre paramètre important est la HLB (balance hydrophile-lipophile). En effet, la HLB permet de chiffrer l'équilibre existant entre la partie hydrophile et la partie lipophile de la molécule de tensioactif. Deux méthodes de calculs existent pour estimer la HLB d'une molécule. La première, introduite par Griffin en 1954, est adaptée aux tensioactifs non-ioniques et est décrite par [16] :

$$HLB = 20 * M_h/M$$

Où, M_h est la masse molaire de la partie hydrophile

Et M est la masse molaire de la molécule.

D'après cette méthode de calcul, la HLB est comprise entre 0 et 20 et peut servir à prédire les propriétés tensioactives de la molécule [16,17]:

- < 10 : insoluble dans l'eau
- > 10 : soluble dans l'eau
- 1,5 à 3 : agent anti-mousse
- 3 à 6 : émulsifiant eau dans huile (W/O)
- 7 à 9 : agent mouillant
- 13 à 15: agent détergent
- 12 à 16 : émulsifiant huile dans eau (O/W)
- 15 à 18 : agent solubilisant

En 1957, Davies a développé une autre méthode de calcul basée sur les différents groupements chimiques de la molécule [18]. Chaque groupement chimique se voit alors attribué une valeur qu'il est possible de retrouver dans des tables. Elle est décrite comme suit :

$$HLB = 7 + \sum_i m_i * H_{hi} - \sum_j n_j * H_{lj}$$

Avec m_i , le nombre de groupes hydrophiles i

H_{hi} la valeur attribuée au groupement i

Et n_j , le nombre de groupes lipophiles j

H_{lj} la valeur attribuée au groupement j .

Les HLB de XOS-OI et XOS-Ric ont été calculées comme environ égale à 15 selon la méthode de Griffin. Toujours selon Griffin, ces molécules tensio-actives pourraient donc avoir des propriétés en détergence, en solubilisation d'agents hydrophobes dans l'eau ou encore comme émulsifiant

d'huile dans eau. Il est difficile de calculer leur HLB selon la méthode de Davies car toutes les valeurs pour les fonctions présentent dans les systèmes étudiés ne sont pas disponibles dans les tables, ces dernières ont néanmoins été estimées à environ 50.

Afin de mettre en perspective les résultats obtenus, les expériences réalisées sur le XOS-OI et XOS-Ric ont également été faites sur le Tween®80. En effet, leurs HLB équivalentes et les caractéristiques moléculaires du Tween®80 sont proches de celles des systèmes étudiés : leurs masses molaires sont proches (1310 g/mol pour le Tween®80 contre environ 2000 g/mol pour les systèmes étudiés) et leurs blocs hydrophobes sont en C18 (Figure 12).

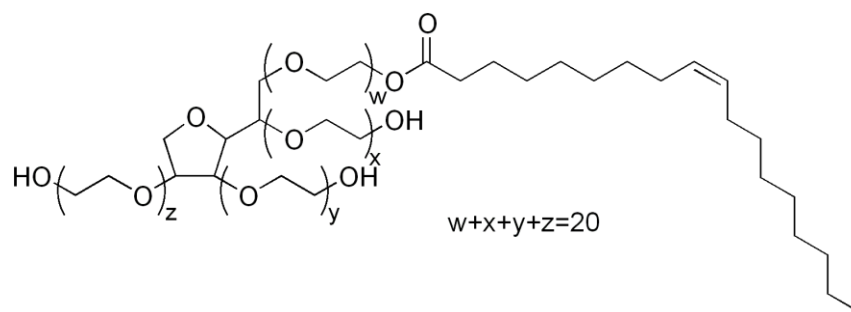


Figure 12. Structure du Tween®80

En revanche, la structure des blocs hydrophiles est différente. En effet, dans le cas du Tween®80, la tête polaire est relativement mobile, déformable et de masse molaire moins importante que celle des XOS-OI et XOS-Ric. La tête polaire du Tween®80 est plutôt sphérique alors celle du XOS-Ric est plutôt rectangulaire, linéaire et rigide (Figure 13). Notons que ce tensioactif commercial est utilisé comme émulsifiant dans les produits alimentaires et pharmaceutiques [14], ainsi que comme agent mouillant [12].



Figure 13. Schéma du système XOS-Ric (a) et du Tween® 80 (b)

Les propriétés tensioactives des XOS-OI et XOS-Ric ont alors été étudiées suivant quatre grandes caractéristiques :

- détermination de la CMC par fluorimétrie,

- mesures des tensions de surface à l'interface air/liquide en fonction de la concentration en tensioactif par la méthode de la goutte pendante,
- mesures des angles de contact statique en fonction de la concentration en tensioactif, ainsi qu'en fonction du substrat,
- détermination du pouvoir moussant par un protocole adapté du test de Ross-Miles.

I. Détermination de la CMC

La CMC a été déterminée par fluorimétrie avec l'utilisation d'une sonde, le pyrène [13,19,20]. Cette méthode s'appuie sur la dépendance de l'intensité des bandes du spectre d'émission à la polarité du solvant (spectre représenté Figure 14). En effet, le pyrène possède cinq vibrations vibroniques majoritaires dont la vibration I vers 370-375 nm (vibration interdite 0-0) qui est très sensible à l'environnement et la vibration III vers 380-385 nm (vibration autorisée 0-2) qui est quasi insensible. Dans un environnement apolaire, l'intensité de la vibration I (I_I) va fortement diminuer, permettant de mesurer la CMC. En effet, à faible concentration en tensioactifs il n'existe pas de micelles, le pyrène est alors en milieu hydrophile. Puis, à partir d'une certaine concentration, il y a formation de micelles, le pyrène qui est hydrophobe va alors se loger au centre des micelles, son environnement devient hydrophobe et le rapport I_I/I_{III} diminue brutalement.

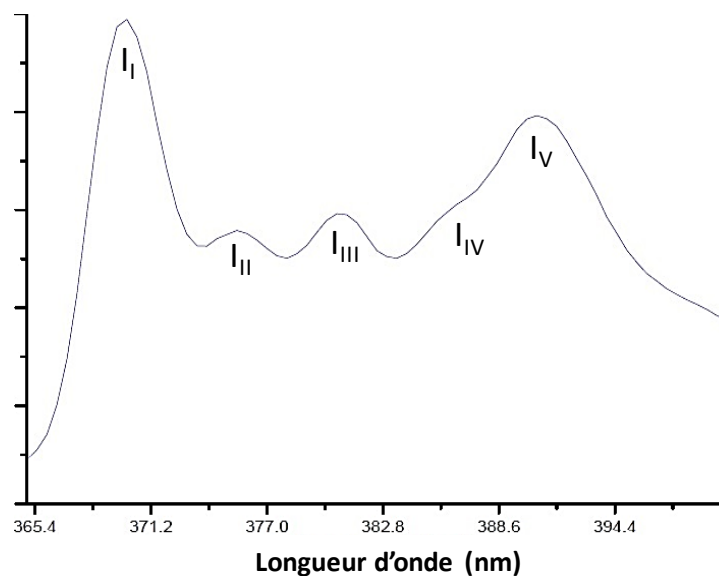


Figure 14. Spectre d'émission du pyrène dans l'eau à 2 µM (concentration faible et excitation à 334 nm pour obtenir le spectre moléculaire du pyrène)

Les valeurs du rapport I_I/I_{III} sont donc tracées en fonction des concentrations étudiées afin de déterminer la CMC, celle-ci correspondant au point d'inflexion de la courbe [20] (Figure 15 pour le Tween®80, Figure 16 pour XOS-OI et Figure 17 pour XOS-Ric). La CMC du Tween®80 a également été mesurée car, en plus d'offrir un premier point de comparaison avec les systèmes étudiés, cette mesure permet d'évaluer la fiabilité de la méthode choisie en comparant la CMC obtenue à la CMC donnée par le fournisseur (entre 13 et 15 mg/L).

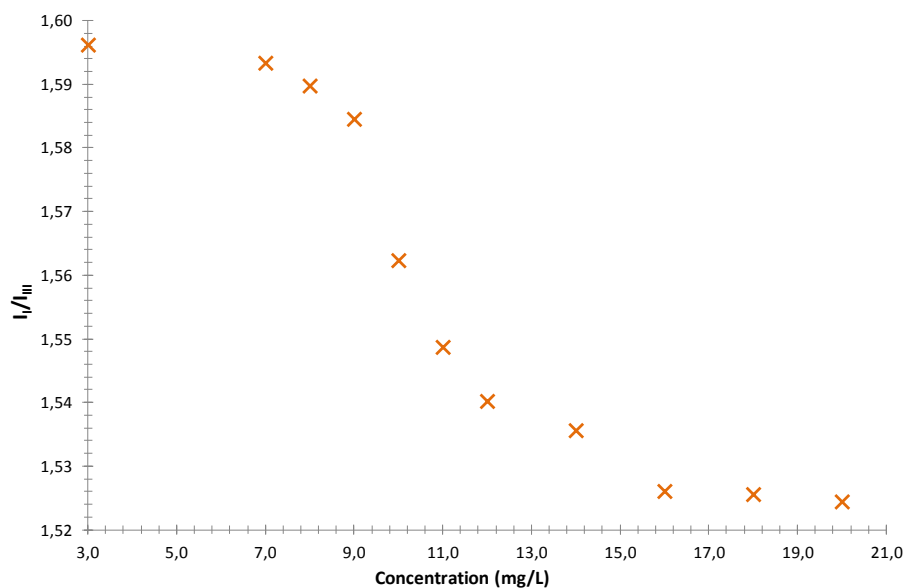


Figure 15. Evolution du rapport I_I/I_{III} en fonction de la concentration de Tween®80

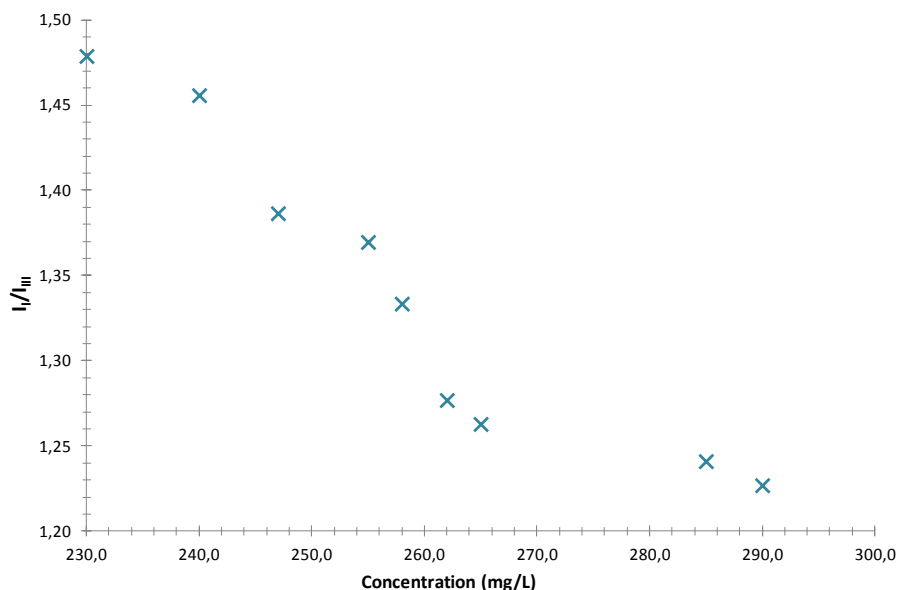


Figure 16. Evolution du rapport I/I_{III} en fonction de la concentration de XOS-OI

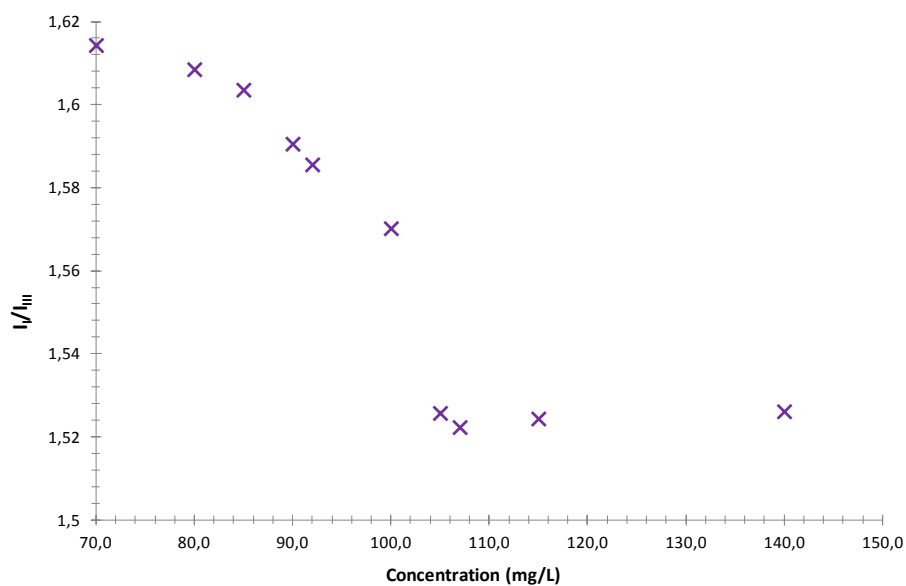


Figure 17. Evolution du rapport I/I_{III} en fonction de la concentration de XOS-Ric

Pour le La CMC Tween®80, la courbe en S caractéristique de cette méthode est retrouvée et la CMC expérimentale est d'environ 10 mg/L, soit légèrement inférieure donc à celle donnée par le fournisseur. Concernant les oligomères amphiphiles synthétisés lors de ce travail de thèse, la courbe en S est moins bien définie et la plage de concentrations auxquelles l'équilibre unimère-micelle est observé est très étendue, ce qui pourrait traduire un système très dynamique. La CMC expérimentale a tout de même été déterminée à environ 260 mg/L pour le XOS-OI et à 100 mg/L pour le XOS-Ric.

La CMC massique des systèmes XOS-OI et XOS-Ric est donc 10 à 26 fois plus élevée que celle du Tween®80. Cet écart entre les CMC est dû au fait que, à blocs hydrophobes identiques, le bloc hydrophile est plus grand dans le cas des oligomères amphiphiles à base de xylane. En effet, lorsque la taille du bloc hydrophile augmente, le nombre de liaisons hydrogène entre le tensioactif et l'eau augmente et la solubilité du tensioactif dans l'eau augmente, de fait, la CMC augmente [14,21]. La CMC massique du XOS-OI est elle-même 2,6 fois plus élevée que la CMC de XOS-Ric. XOS-Ric présente donc une CMC bien inférieure à celle de XOS-OI, ce qui pourrait d'expliquer par la présence de 'dimère ricinoléate' couplés à des oligomères de xylane dans le cas du XOS-Ric.

II. Tension de surface air/liquide

Les tensions de surface air/liquide ont été estimées par la méthode de la goutte pendante. Ces mesures vont à la fois permettre d'observer un éventuel effet tensioactif des systèmes étudiés sur la surface air/liquide mais aussi de confirmer les CMC obtenues par fluorimétrie.

La gravité ainsi que la tension de surface déterminent la géométrie d'une goutte. Hors de l'équilibre physique de la goutte, ces forces dépendent respectivement du volume et de la surface de la goutte, ce qui conduit le plus souvent à des gouttes sphériques. A l'équilibre, en revanche, les forces s'annulent et la géométrie de la goutte dépend uniquement de sa taille, de la différence de densité entre le liquide et le fluide environnant – le plus souvent l'air –, et de la tension de surface [13,22]. Ainsi, en faisant pendre une goutte d'une fine aiguille à l'aide d'une seringue, il est possible, à partir de ses dimensions, de déterminer sa tension de surface. Les valeurs de tension de surface sont tracées en fonction des concentrations étudiées afin de déterminer la CMC, celle-ci correspondant au premier changement de pente important de la courbe (Figure 18). Les CMC expérimentales déterminées par la méthode de la goutte pendante corrélaient tout à fait à celles obtenues par fluorimétrie.

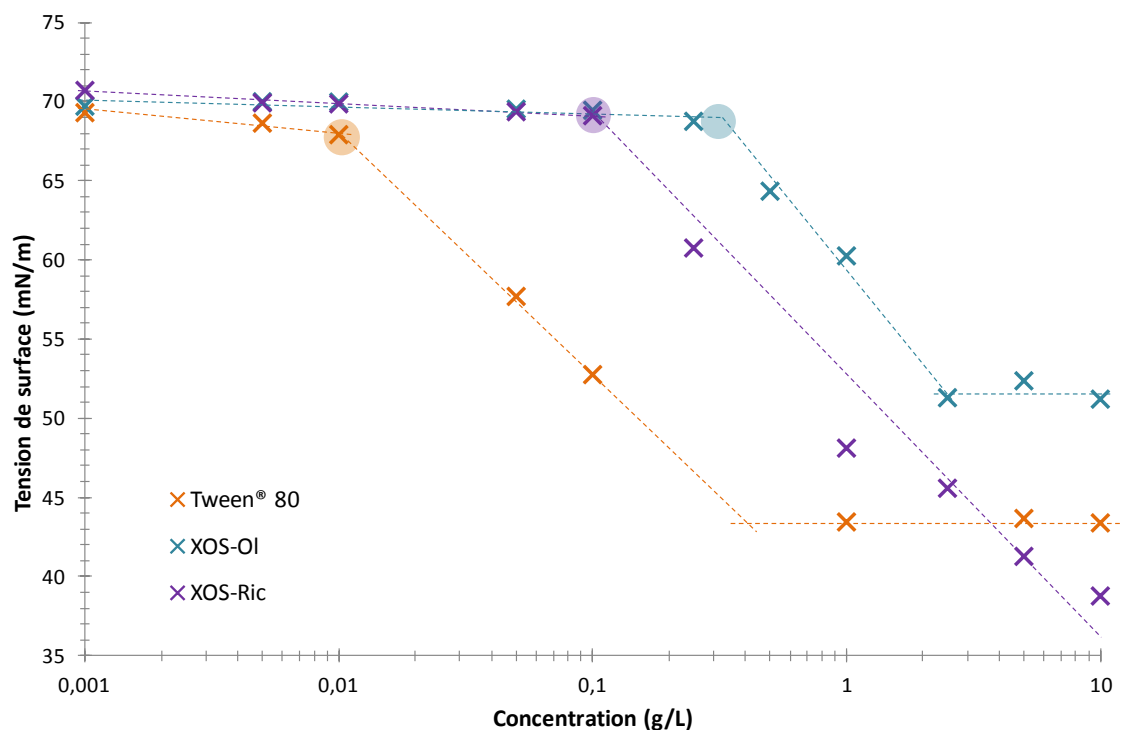


Figure 18. Courbes exprimant la tension de surface en fonction de la concentration pour le Tween®80 (en orange), le XOS-OI (en bleu) et le XOS-Ric (en violet)

Quelque soit le tensioactif étudié, la Figure 18 montre que l'ajout de tensioactif permet d'abaisser la tension de surface de l'eau. Afin de comparer les différents tensioactifs, la différence de tension de surface entre l'eau pure et une solution à 10 g/L a été calculée. Ces résultats montrent que le système XOS-Ric semble être aussi performant que le Tween®80 alors que le système XOS-OI le serait moins. Notons néanmoins que les courbes obtenues n'ont pas l'allure attendue (diminution de la tension de surface puis palier). Cela pourrait s'expliquer par le fait que lors de la mesure des tensions de surface les molécules de tensioactifs n'étaient pas à la surface de la goutte, l'équilibre n'était pas atteint [23].

Tableau 2. Tableau récapitulatif des différences de tension de surface (γ) entre l'eau pure et une solution à 10 g/L en tensioactif pour le Tween®80, XOS-OI et XOS-Ric

	XOS-Ric	XOS-OI	Tween®80
γ eau pure (mN/m)	70	70	70
γ à 10 g/L (mN/m)	38	52	43
$\Delta\gamma$ (mN/m)	32	18	27

III. Mouillage

Des applications dans le domaine du traitement de surface sont envisagées pour les XOS-OI et XOS-Ric, il est donc essentiel d'étudier leur capacité à mouiller différentes surfaces. Pour ce faire, il a été choisi de mesurer les angles de contact entre une goutte de solution aqueuse de tensioactif et un substrat sur laquelle elle a été déposée. Quatre substrats différents ont été étudiés, à savoir, par ordre d'hydrophobicité croissant, du verre, du poly(téréphtalate d'éthylène) (**PET**), du ruban adhésif de grande distribution type 'scotch' ainsi que du polytétrafluoroéthylène (**PTFE**).

Il se trouve que les solutions aqueuses de Tween®80 ainsi que de XOS-OI et XOS-Ric mouillent totalement le verre comme le montre la Figure 19. En effet, l'angle de contact étant inférieur à 10° le mouillage est considéré comme total : aucune mesure fiable ne peut être réalisée. Seuls les trois autres substrats feront donc l'objet d'une discussion. Les mesures d'angle de contact ont été tracées en fonction de la concentration en XOS-OI, XOS-Ric et en Tween®80 pour les trois substrats étudiés : PET en Figure 20, ruban adhésif en Figure 21 et PTFE en Figure 22.



Figure 19. Dépôt d'une goutte de solution aqueuse de XOS-Ric à 2,5 g/L dans l'eau sur substrat verre

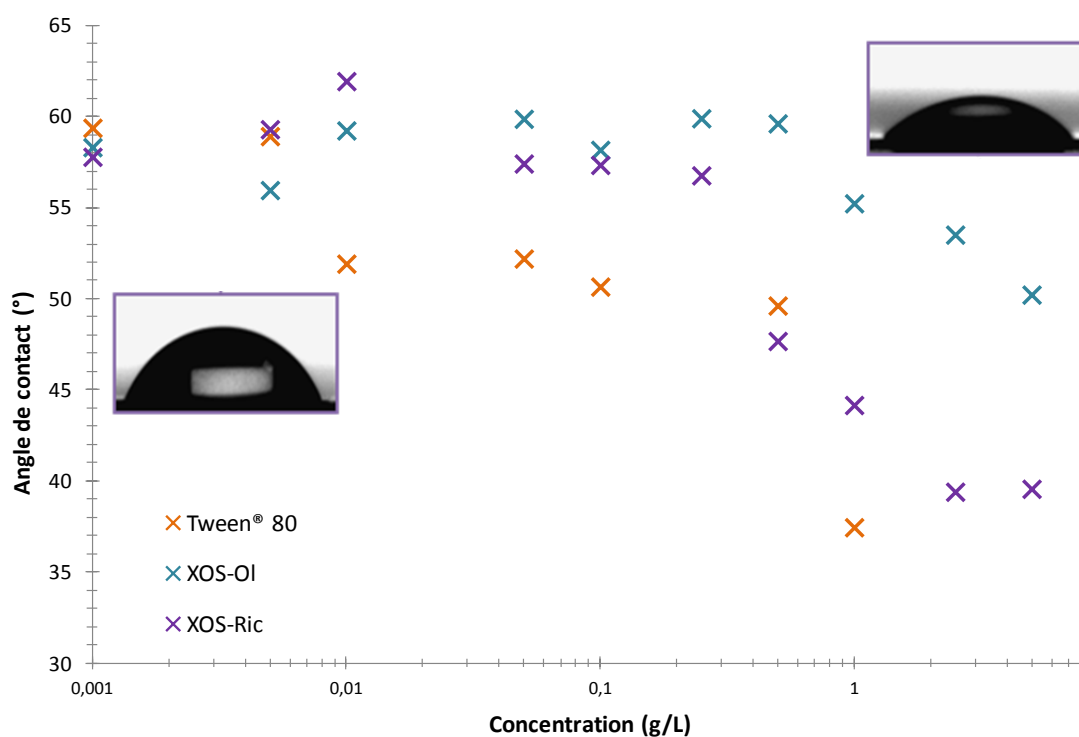


Figure 20. Angles de contact entre le PET et une goutte des solutions aqueuses de tensioactif en fonction de la concentration (Tween®80 en orange, XOS-OI en bleu et XOS-Ric en violet).

L'angle de contact de l'eau pure est mesuré égal à 59,3°

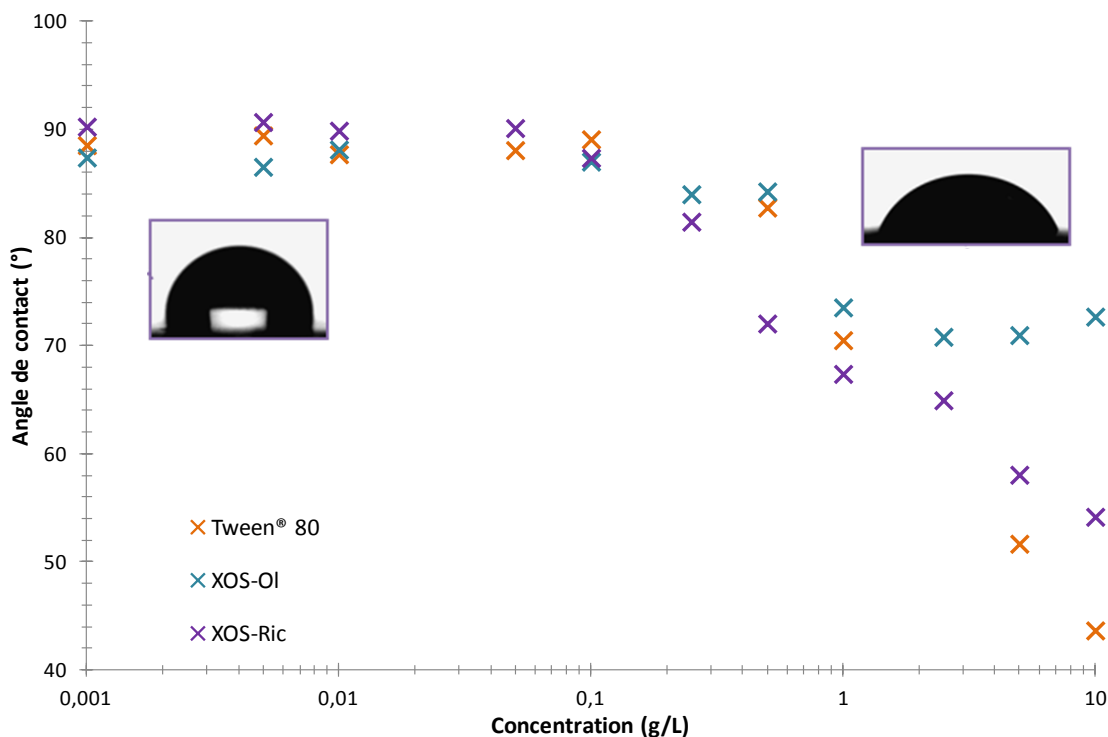


Figure 21. Angles de contact entre le ruban adhésif et une goutte des solutions aqueuses de tensioactif en fonction de la concentration (Tween®80 en orange, XOS-OI en bleu et XOS-Ric en violet).

L'angle de contact de l'eau pure est mesuré égal à 90,7°

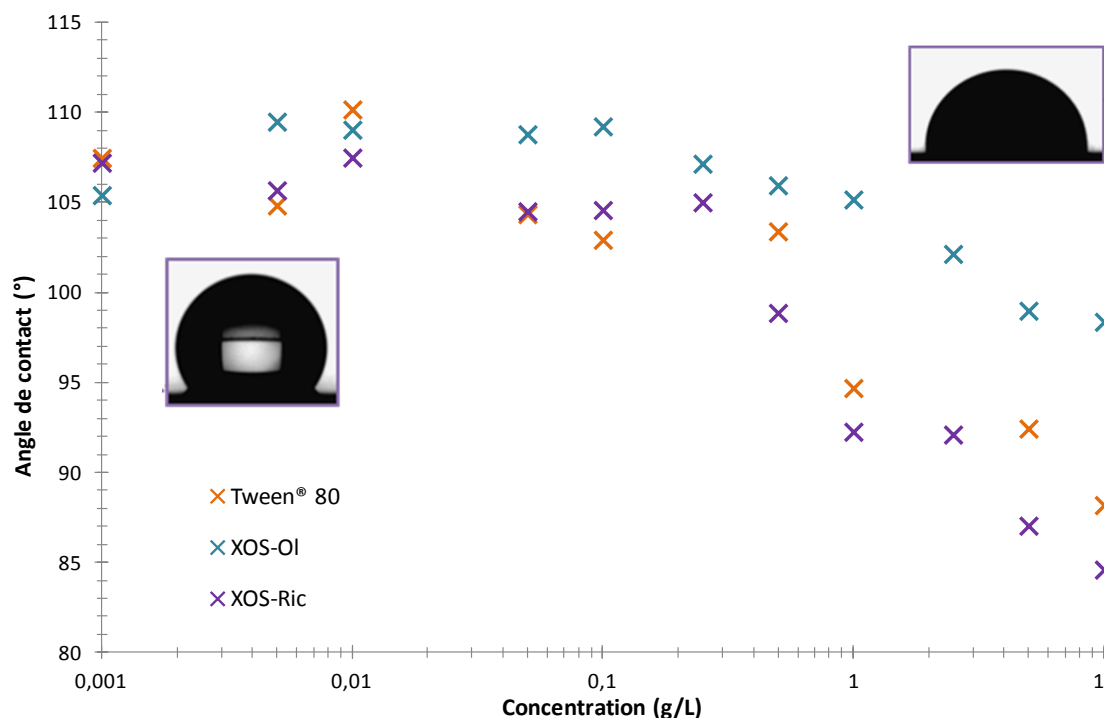


Figure 22. Angles de contact entre la surface de PTFE et une goutte des solutions aqueuses de tensioactif en fonction de la concentration (Tween®80 en orange, XOS-OI en bleu et XOS-Ric en violet).
L'angle de contact de l'eau pure est mesuré égal à 106,8°

Quel que soit le substrat étudié, le Tween®80 ou le XOS-Ric ont des effets similaires sur le mouillage : la différence entre les angles de contact à chaque concentration est inférieure à 5°. Ce qui indique que l'ajout de XOS-Ric permet de mouiller aussi bien les différents substrats que l'ajout de Tween®80. Le XOS-Ric est donc compétitif par rapport au Tween®80 en ce qui concerne le mouillage de surface. De plus, l'ajout de tensioactifs entraîne une diminution de l'angle de contact et donc améliore le mouillage. Le XOS-OI semble quant à lui moins performant, ce qui est cohérent avec les observations réalisées sur la tension de surface liquide/air.

La diminution de l'angle de contact observée peut s'expliquer par le phénomène d'adsorption. En effet, à faible concentration, il y a peu de molécules de tensioactif à l'interface substrat/liquide, l'affinité entre le substrat, d'une certaine hydrophobicité, et le liquide est alors relativement faible. L'étalement de la goutte n'est pas favorisé, d'où une interface peu développée : l'angle de contact est donc maximal. En revanche, lorsque la concentration en tensioactif augmente, de plus en plus de molécules tensioactives se trouvent à la surface de la

goutte et s'adsorbent à l'interface substrat/liquide, augmentant ainsi l'affinité entre le solide et le liquide. Ainsi, l'énergie de surface du solide est diminuée, favorisant l'étalement de la goutte et donc la surface de contact solide/liquide augmente, d'où un angle de contact de plus en plus faible [12].

Selon les substrats étudiés, deux comportements différents sont observés :

- Avec le PET (d'hydrophilie la plus élevée) et le PTFE (d'hydrophilie la plus basse), l'angle de contact entame une diminution à une certaine concentration puis un plateau est observé : comportement typique qui ne décrit que la modification de la tension de surface
- Avec le ruban adhésif (d'hydrophilie intermédiaire), l'angle de contact diminue régulièrement à partir d'une certaine concentration sans atteindre de plateau : comportement qui, en sus de la modification de la tension de surface, montre une adsorption du tensioactif sur le substrat.

Le XOS-Ric pourrait donc potentiellement être utilisé comme agent mouillant pour des revêtements de surface. Or, pour ce type d'application, des solutions concentrées en tensioactif sont généralement utilisées, et il est nécessaire que ces solutions moussent le moins possible afin d'assurer un contact optimal avec le substrat [24]. Le pouvoir moussant du XOS-Ric a donc été évalué. Il est intéressant de comparer le pouvoir moussant de ces deux tensioactifs puisque le Tween®80 est d'ores et déjà utilisé comme agent mouillant [12].

IV. Pouvoir moussant

Lors de la mise en solution du XOS-Ric dans l'eau, une mousse se forme à la surface du liquide. Le XOS-Ric possède donc une certaine capacité à mousser : un pouvoir moussant. Ce dernier peut être déterminé par le test de Ross-Miles, test normé [25], utilisé en industrie pour caractériser les composés tensioactifs. La hauteur de mousse formée par le XOS-Ric dans l'eau ainsi que sa stabilité ont été étudiées et comparées à la mousse formée par le Tween® 80 (Tableau 3).

Tableau 3. Résultats de stabilité des mousses obtenues avec le XOS-Ric et le Tween®80 dans l'eau

Temps (min)	Tween®80		XOS-Ric	
	Hauteur (mm)	Stabilité (%)	Hauteur (mm)	Stabilité (%)
0	23	100	10	100
1	20	84 ± 5	3	30 ± 3
2,5	19	78 ± 3	0	0
167	0	0	x	x

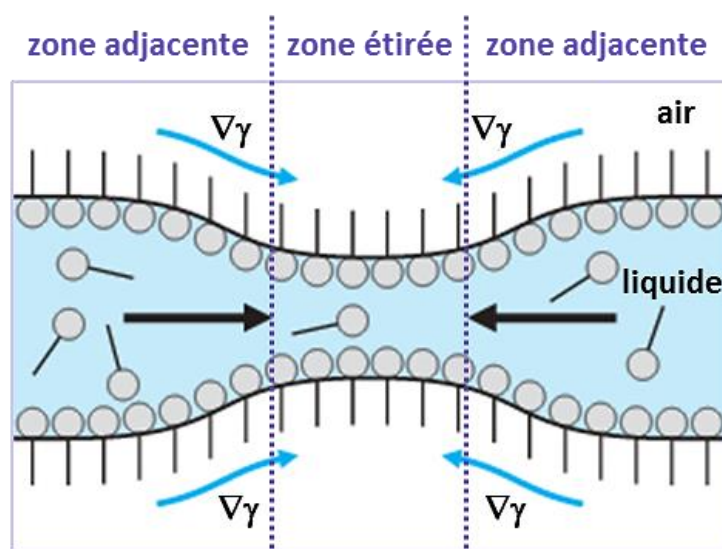
Au temps initial, la hauteur de la mousse formée par le Tween®80 est plus importante que celle formée par le XOS-Ric. De plus, après 2,5 minutes, la mousse obtenue avec le XOS-Ric a totalement disparu alors que celle du Tween®80 est encore à 78% de sa hauteur initiale. Cette dernière ne disparaît qu'au bout de 167 minutes. La mousse obtenue avec le XOS-Ric apparaît donc plus fine et moins stable que celle formée avec le Tween®80.

Une mousse se forme lorsque des bulles d'air sont générées dans un liquide, augmentant la tension superficielle à l'interface air/liquide. Les molécules tensioactives vont alors s'adsorber aux interfaces air/liquide pour diminuer la tension de surface et ainsi stabiliser la mousse. La vitesse d'adsorption dépend de la taille des molécules, ainsi plus les molécules sont petites plus la vitesse d'adsorption est grande et plus vite l'équilibre est atteint.

Les bulles d'air se déplacent rapidement sous l'effet de la poussée d'Archimède et s'accumulent à la surface libre du liquide, induisant un étirement des films de liquide qui se forment entre la surface libre et les bulles, ainsi qu'entre les bulles elles-mêmes. Ces films doivent alors résister à l'étirement pour que la mousse soit stable : c'est l'effet Gibbs-Marangoni (Figure 23).

L'étirement du film liquide engendre une augmentation locale de la tension de surface. Il existe alors un gradient de tension superficielle entre la zone étirée du film et la zone adjacente. Ce gradient provoque la migration de molécules tensioactives de la couche adsorbée adjacente vers la zone étirée du film, moins peuplée [15,24].

Le XOS-Ric, possédant une tête polaire plus importante et plus rigide que le Tween®80, est moins mobile. Par conséquent la mousse formée par celui-ci est plus fine et moins stable.



avec $\nabla\gamma$ le gradient de tension superficielle

Figure 23. Effet Gibbs-Marangoni : le gradient de tension superficielle entraîne la migration des molécules tensioactives. Adapté de Salager et Choplin (2008) [24]

Conclusion

Les oligomères amphiphiles, XOS-OI et XOS-Ric, présentent des propriétés d'auto-assemblage à la fois dans le chloroforme et dans l'eau. Quel que soit le solvant, ces systèmes forment des objets de tailles micellaires ($d \approx 50$ nm) qui vont s'associer entre eux pour former des agrégats dont la taille varie avec la concentration. Ces agrégats sont régis par des associations assez faibles pour être en équilibre dynamique puisque les mêmes objets sont obtenus quelle que soit la méthode de préparation des solutions utilisées : dissolution directe ou dilution. Ils peuvent être éliminés par dilution ou filtration

Ce phénomène d'agrégation est d'autant plus marqué dans le chloroforme, spécialement pour le système avec le segment 'ricinoléate' puisque les groupements hydroxyle présents en surface des micelles inverses vont créer des interactions hydrogène entre les différents objets et ainsi favoriser l'agrégation.

Dans l'eau, il y a formation de micelles directes et l'agrégation est moins marquée car il existe peu d'interaction entre les différents objets : ce sont les XOS, très solubles dans l'eau, qui sont à la surface des objets. Les systèmes sont alors plus proches de leur état d'équilibre.

La CMC des systèmes XOS-OI et XOS-Ric ont été déterminées à 260 mg/L et 100 mg/L, respectivement. Ces valeurs de CMC assez élevées qui peuvent s'expliquer par la rigidité du bloc XOS. Les propriétés tensioactives des oligomères amphiphile ont été étudiées par la mesure de la tension de surface liquide/air en fonction de la concentration et par la mesure de l'évolution des angles de contact en fonction de la concentration sur trois substrats plus ou moins hydrophiles. Le XOS-Ric est aussi performant que le Tween®80 en ce qui concerne l'abaissement de la tension de surface liquide/air et le mouillage, sans compter que son pouvoir moussant est moindre ce qui est un atout non négligeable dans le domaine des revêtements de surface. De plus, le bloc hydrophile du XOS-Ric est bio-sourcé, *a contrario* du Tween®80. Le système XOS-OI semble quant à lui moins performant.

Références

- [1] Bonnacaze R, Cloitre M. Micromechanics of Soft Particle Glasses. In: Cloitre M, editor. High Solid Dispersions SE - 90, vol. 236, Springer Berlin Heidelberg; 2010, p. 117–61.
- [2] Loh W. Block copolymer micelles. *Encycl. Surf. colloid Sci.* Marcel Dek, 2002, p. 802–13.
- [3] Mai Y, Eisenberg A. Self-assembly of block copolymers. *Chem Soc Rev* 2012;41:5969–85.
- [4] Hadjichristidis N, Pispas S, Floudas G. DILUTE SOLUTIONS OF BLOCK COPOLYMERS IN SELECTIVE SOLVENTS. *Block Copolym. Synth. Strateg. Phys. Prop. Appl.* John Wiley, 2003, p. 203–31.
- [5] Tuzar Z, Kratochvil P. Block and graft copolymer micelles in solution. *Adv Colloid Interface Sci* 1976;6:201–32.
- [6] Drappier C. Auto-assemblages biofonctionnels à base de conjugués polymère-b-peptide. Thèse de l'Université de Bordeaux I, 2013.
- [7] Riess G. Micellization of block copolymers. *Prog Polym Sci* 2003;28:1107–70.
- [8] Israelachvili JN, Mitchell DJ, Ninham BW. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *J Chem Soc Faraday Trans 2 Mol Chem Phys* 1976;72:1525–68.
- [9] Antonietti M, Förster S. Vesicles and Liposomes: A Self-Assembly Principle Beyond Lipids. *Adv Mater* 2003;15:1323–33.
- [10] Klok H-A, Lecommandoux S. Supramolecular materials via block copolymer self-assembly. *Adv Mater* 2001;13:1217–29.
- [11] Lim Y-B, Moon K-S, Lee M. Rod-coil block molecules: Their aqueous self-assembly and biomaterials applications. *J Mater Chem* 2008;18:2909–18.
- [12] Larpent C. Tensioactifs. *Constantes Chim* 1995:1–6.
- [13] Dominguez A, Fernandez A, Gonzalez N, Iglesias E, Montenegro L, Domínguez A, et al. Determination of Critical Micelle Concentration of Some Surfactants by Three Techniques. *J Chem Educ* 1997;74:1227–31.
- [14] Bognolo G. Tensioactifs non ioniques - Mise en œuvre industrielle. *Mise En Forme Des Médicaments* 2013:1–11.
- [15] Vergès M. Les secrets des mousses. *Découverte* 2005:24–31.

- [16] Griffin WC. Calculation of HLB Values of Non-Ionic Surfactants. *J Soc Cosmet Chem* 1954;5:249–56.
- [17] Griffin WC. Classification of Surface-Active Agents by “HLB.” *J Soc Cosmet Chem* 1949;1:311–26.
- [18] Davies JT. A quantitative kinetic theory of emulsion type. I. Physical chemistry of the emulsifying agent. *Gas/Liquid Liq. Interface (Proceedings Int. Congr. Surf. Act., 1957, p. 426–38.*
- [19] Zeng J, Shi K, Zhang Y, Sun X, Deng L, Guo X, et al. Synthesis of poly(N-isopropylacrylamide)-b-poly(2-vinylpyridine) block copolymers via RAFT polymerization and micellization behavior in aqueous solution. *J Colloid Interface Sci* 2008;322:654–9.
- [20] Aguiar J, Carpena P, Molina-Bolívar JA, Carnero Ruiz C. On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1:3 ratio method. *J Colloid Interface Sci* 2003;258:116–22. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9797\(02\)00082-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9797(02)00082-6).
- [21] Rotta J, Pham PD, Lapinte V, Borsali R, Minatti E, Robin J-J. Synthesis of Amphiphilic Polymers Based on Fatty Acids and Glycerol-Derived Monomers – A Study of Their Self-Assembly in Water. *Macromol Chem Phys* 2014;215:131–9.
- [22] Evans DF, Wennerström H. Surface Chemistry and Monolayers. In: Wiley-VCH, editor. *Colloid. DOMAIN Where Phys. , Chem. , Biol. , Technol. Meet.* 2eme édit, New York: 1999, p. 47–97.
- [23] Damez C, Bouquillon S, Harakat D, Hénin F, Muzart J, Pezron I, et al. Alkenyl and alkenoyl amphiphilic derivatives of d-xylose and their surfactant properties. *Carbohydr Res* 2007;342:154–62.
- [24] Salager J-L, Choplin L. Mousses : Formation , formulation et propriétés. *Génie des Procédés*, vol. 14. T. I., Techniques de l’Ingénieur; 2008, p. 1–14.
- [25] ASTM D1173-53. Standard test method for foaming properties of surface-active agents. *ASTM Int* 2001.

Conclusion générale et perspectives



L'objectif de cette thèse était de trouver une nouvelle voie de valorisation des xylanes du bois, coproduits potentiels de l'industrie papetière, par la synthèse de nouveaux polymères amphiphiles. La conception de nouveaux matériaux polymères issus d'hémicelluloses présente un fort intérêt en raison du caractère biocompatible et biodégradable de ce polysaccharide.

Dans ce contexte, la première partie du travail a été consacrée aux xylanes.

Tout d'abord, des xylanes de hêtre ont été complètement caractérisés par des techniques d'analyse classiques telles que la chromatographie d'exclusion stérique ou encore la spectroscopie RMN. Différents lots de xylanes de hêtre ainsi que des xylanes de bouleau ont ainsi pu être caractérisés et comparés. Les xylanes que nous avons utilisés, ou plus précisément les 4-*O*-méthyleglucuronoxylanes, sont extraits en milieu alcalin, et sont par conséquent désacétylés. Tous les xylanes étudiés sont très similaires et se différencient par leur degré de polymérisation et leur nombre de motifs acide méthyleglucuronique (**MeGlcA**).

Ces xylanes ont ensuite été hydrolysés en milieu acide dilué pour obtenir des xylo-oligosaccharides (**XOS**) bien définis. Dans une approche en faveur d'une industrialisation, l'hydrolyse acide a été privilégiée par rapport à l'hydrolyse enzymatique, en raison de sa simplicité de mise en œuvre et de son faible coût. La mise en place d'un plan d'expériences pour l'optimisation des conditions d'hydrolyse a permis de mettre en évidence la présence de deux fractions : les xylanes solubilisés, faciles à hydrolyser, et les xylanes agrégés. Parmi tous les paramètres étudiés, concentration en xylanes, concentration en acide, température et durée de réaction, la température est le paramètre le plus influant. Conjointement à l'optimisation des conditions d'hydrolyse (0,7 M d'acide sulfurique, pendant 45 minutes à 90°C), les conditions de purification du produit d'hydrolyse l'ont également été. Toujours en vue d'une industrialisation potentielle, une méthode simple et économique de purification par précipitation sélective à l'éthanol a été privilégiée.

L'étude de l'hydrolyse des xylanes en milieu acide dilué a révélé, de manière surprenante, l'obtention de XOS, de masse molaire d'environ 3000 g/mol (calibration pullulane), stables dans la gamme des conditions d'hydrolyse utilisée. En réalisant l'hydrolyse sur différents lots de xylanes, il a aussi été démontré que l'obtention de ces XOS, particulièrement stables dans ces

conditions douces, est reproductible. Une caractérisation complète de ses XOS, par RMN et MALDI-TOF, montre que ces oligomères ont principalement 6 unités xylose par chaîne, avec une seule unité MeGlcA positionnée à l'extrémité non-réductrice. Malgré les efforts entrepris à la compréhension de ce phénomène, le mécanisme permettant l'obtention de ces XOS particuliers reste non élucidé.

Les XOS ont été fonctionnalisés sur leur extrémité réductrice par amination réductrice. Cette réaction, réalisée dans l'eau, a permis d'apporter deux nouvelles fonctionnalités aux XOS, *i.e.* un groupement azoture et une fonction allyle. L'amination réductrice, déjà beaucoup étudiée, en particulier au laboratoire avec des dextrans et hyaluronanes, est quantitative sur les XOS comme il a été démontré par les analyses RMN DOSY. Ces fonctionnalités, azoture et allyle, sont réactives par chimie 'click' et ont permis d'entreprendre le couplage de ces XOS fonctionnels à d'autres blocs par cyclo-addition de Huisgen et couplage thiol-ène respectivement. Le choix de blocs hydrophobes conduira à des composés amphiphiles.

Parallèlement, les xylanes extraits de hêtre ont aussi été modifiés par oxydation au periodate de sodium dans le but d'amener, de manière contrôlée, un certain nombre de fonctions aldéhyde le long de la chaîne. L'étude de l'oxydation a montré qu'il était possible d'oxyder les xylanes sans dépolymérisation en utilisant 5 mol.% et 20 mol.% de periodate. De même, aucune dépolymérisation n'a été observée jusqu'à 80°C permettant ainsi d'augmenter la cinétique de la réaction. Enfin, en réalisant l'oxydation sur différents lots de xylanes, il a aussi été démontré que la réaction est reproductible. Les fonctions aldéhyde ainsi introduites pourront permettre l'introduction de nouveaux groupements fonctionnels, analogues à ceux introduits sur les XOS, par amination réductrice. Un couplage de ces xylanes fonctionnels à d'autres blocs, porteurs de la fonction antagoniste, permettrait d'accéder à des copolymères de morphologie en 'peigne'.

La seconde partie du travail a donc consisté à synthétiser les blocs à fonctions antagonistes aux XOS fonctionnalisés azoture et allyle, puis à réaliser les couplages.

Des dérivés d'acide gras ont été choisis comme blocs à coupler aux XOS fonctionnels. Ces derniers présentent les avantages d'être hydrophobes et bio-sourcés. De plus, leur valorisation comme monomères fonctionnels a déjà été étudiée, notamment au sein de notre équipe. Des esters méthyliques d'oléate et de ricinoléate ont alors été modifiés soit par thiol-ène avec

l'éthanedithiol soit par transestérification avec le butyn-1-ol, pour apporter une fonctionnalité thiol ou alcyne respectivement.

Ces dérivés d'acide gras ont ainsi pu être couplés aux XOS fonctionnels. Le couplage thiol-ène a été employé pour lier les XOS fonctionnalisés allyle aux dérivés d'acide gras fonctionnalisés thiol. Les conditions opératoires de ce dernier ont été optimisées jusqu'à atteindre une conversion satisfaisante mais non totale. Il pourrait néanmoins être intéressant d'étudier les propriétés physico-chimiques de ce mélange oligomère amphiphile/XOS.

Le couplage azoture-alcyne ou cycloaddition de Huisgen a été employé pour lier les XOS fonctionnalisés azoture aux dérivés d'acide gras fonctionnalisés alcyne. Cette réaction, déjà employée dans beaucoup d'études sur les polysaccharides, en particulier au laboratoire, a permis d'obtenir de manière rapide les oligomères amphiphiles, soit avec le segment 'oléate' soit avec le segment 'ricinoléate'. Les propriétés physico-chimiques de ces derniers ont ainsi pu être étudiées.

Les copolymères obtenus par couplage azoture-alcyne s'auto-assemblent en solution, à la fois dans l'eau et dans le chloroforme, et forment des micelles homogènes. Leur auto-assemblage se fait spontanément par dissolution directe sans étape préalable, notamment sans l'utilisation d'un co-solvant nécessitant une étape de dialyse, très chronophage. Ce phénomène est probablement favorisé par la mobilité des chaînes grasses. Ces micelles ont tendance à s'associer pour former des agrégats. Néanmoins, les associations régissant cette agrégation sont assez faibles pour permettre un équilibre dynamique et ainsi éliminer les agrégats par simple dilution ou filtration. Il est envisageable d'extruder les solutions pour obtenir des micelles bien homogènes, sans agrégat. Des analyses complémentaires, type SLS ou AFM, pourraient être effectuées afin de caractériser plus finement les objets obtenus. De plus, il serait opportun d'étudier la ségrégation de ces objets en masse.

Enfin, les propriétés tensioactives de ces copolymères ont été étudiées par mesure de tension de surface, mesure d'angles de contact et estimation du pouvoir moussant. Les CMC des oligomères amphiphiles XOS-OI et XOS-Ric ont été mesurées à 260 mg/L et 100 mg/L,

respectivement par fluorimétrie avec le pyrène. Ces oligomères amphiphiles sont comparables au Tween® 80 en termes de HLB et de masses molaires. XOS-Ric semble posséder des propriétés tensioactives similaires à ce dernier et pourrait donc potentiellement le concurrencer de par son caractère bio-sourcé. XOS-OI semble quant à lui être moins performant que le Tween® 80.

Sur le plan fondamental, quelques questions restent en suspens dont la plus importante concerne l'obtention de XOS. Il serait intéressant d'élucider par quel mécanisme il est possible de former des XOS stables dans des conditions douces d'hydrolyse dont la structure est contrôlée, avec une seule unité MeGlcA positionnée à l'extrémité réductrice. Pour cela, il serait intéressant d'isoler les différents produits de l'hydrolyse, mais aussi ceux issus de la réaction de peeling, afin de les caractériser finement.

Sur le plan appliqué, l'étude physico-chimique des polymères devra aussi être approfondie pour envisager certaines applications précises telles que l'encapsulation de principes actifs. L'étude de la biodégradabilité, ainsi que celle de la biocompatibilité, des copolymères doivent aussi être effectuées. Il semble également opportun de faire une étude des propriétés nutritionnelles et biomédicales des XOS afin de les valoriser autrement.

Outre ses perspectives, il est aussi important de s'intéresser à la conception d'autres copolymères. D'un côté, il est possible d'étudier l'influence de la longueur du bloc hydrophobe sur les propriétés physico-chimiques des copolymères à blocs, et ainsi élargir le champ des applications possibles. De l'autre, la voie 'oxydation au periodate de sodium' devrait conduire à des copolymères en peigne. Les propriétés de ces polymères seraient alors très différentes de celles des copolymères à blocs et ils pourraient être utilisés pour le revêtement de surfaces.

En conclusion, ce travail propose une réponse originale aux questions concernant la valorisation des coproduits potentiels de l'industrie papetière et de la bioraffinerie forestière. Le développement d'un tel projet nécessite une approche pluridisciplinaire basée sur la chimie du bois et plus particulièrement des polysaccharides, la chimie des matériaux et la physico-chimie des systèmes auto-assemblés.

Partie expérimentale



Sommaire

Partie A.	240
Matériels et Méthodes	240
I. Matériels	240
II. Spectroscopies	241
II.1. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	241
II.1.1. Des xylanes et leurs dérivés	241
II.1.2. Des dérivés d'acide gras	242
II.2. Spectrométrie d'absorption UV-Visible	243
II.3. Spectrométrie Infra-Rouge	243
II.4. Désorption-ionisation laser assistée par matrice à analyseur à temps de vol (MALDI-TOF)	243
II.5. Ionisation par électronébulisation (ESI)	243
III. Chromatographies	244
III.1. En phase liquide à haute performance (HPLC)	244
III.2. En phase liquide flash (FC)	244
III.3. En phase gazeuse (GC)	244
III.3.1. GC-FID des xylanes	244
III.3.2. GC-FID des dérivés d'acide gras	245
III.4. Par exclusion stérique (SEC)	245
III.4.1. SEC-RI des xylanes	245
III.4.2. SEC-RI/MALLS des xylanes	246
III.4.3. SEC-RI/UV des dérivés d'acide gras	246
IV. Analyses thermiques	246
IV.1. Analyse thermogravimétrique (TGA)	246
IV.2. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)	247
V. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)	247
VI. Microscopie électronique en transmission (TEM)	247
VII. Fluorimètre	247

VIII. Goniomètre	248
Partie B.	249
Modes opératoires.....	249
I. Chapitre I	249
I.1. Ultrafiltration.....	249
I.2. Hydrolyse totale	249
I.3. Acétylation	250
II. Chapitre II	250
II.1. Synthèse des XOS	250
II.2. Dosage du furfural.....	251
II.3. Réaction de peeling.....	251
III. Chapitre III.....	252
III.1. Oxydation au periodate de sodium.....	252
III.2. Suivi de la consommation du periodate	252
III.2.1. Titrage iodométrique	252
III.2.2. Suivi par absorbance	253
III.3. Titrage des aldéhydes à l'hydroxylamine chlorhydrate	253
III.4. Synthèse de l'azoture d'aminoéthyle	254
III.5. Amination réductrice	254
IV. Chapitre IV	254
IV.1. Réaction de thiol-ène	254
IV.2. Réaction de transestérification	255
IV.3. Couplage thiol-ène	255
IV.4. Couplage azoture-alcyne.....	255
V. Chapitre V	256
V.1. Détermination de la CMC par fluorimétrie	256
V.2. Mesure des tensions de surface	256
V.3. Mesure des angles de contact	257
V.4. Test de Ross-Miles.....	257
Références.....	258

Partie A.

Matériels et Méthodes

I. Matériels

Acros Organics

L'éthanedithiol (95%), le 3-butyn-1-ol (97%) et le sulfate de magnésium sont fournis par Acros Organics.

Alfa Aesar

L'oléate de méthyle (**MeOl**, 96%), la benzyle amine (98%), l'allyle amine (98+%), le sulfate de sodium, l'ascorbate de sodium, et le sodium tétrahydridoborate sont fournis par Alfa Aesar.

FCBA

Le lot 8 de xylanes de bouleau est fourni par le FCBA.

Nu-Chek Prep

Le ricinoléate de méthyle (**MeRic**, 99%) est fourni par Nu-Chek Prep.

Prolabo

L'anhydride acétique, le thiodène, le sulfate de cuivre, ainsi que les hydroxydes de baryum, de potassium et de sodium sont fournis par Prolabo.

Sigma Aldrich

Les lots 1 à 4 de xylanes de hêtre (X-4252, $\geq 90\%$), le lot 7 de xylanes de bouleau (X-0502, $\geq 90\%$), le furfural ($\geq 98\%$), l'acide chlorhydrique, l'acide acétique, l'azoture de sodium, le chlorure de sodium, le periodate de sodium ($\geq 99,8\%$), le tétrahydruoborate de sodium, le cyanoborohydrure de sodium, le phosphate de sodium dibasique, le bromure de potassium, le Tween® 80, le pyrène (99%), l'hydroxylamine chlorhydrate, le 2-chloroéthylamine hydrochlorate, le 1-methylimidazole, le 2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone (**DMPA**, 99%), le 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ène (**TBD**, 98%), ainsi que le chloroforme, le cyclohexane, l'acétonitrile, l'acétate d'éthyle, le diéthyle éther, le méthanol (**MeOH**), l'isopropanol (**iPrOH**), le diméthyle sulfoxide (**DMSO**), le dichlorométhane (**DCM**), le tétrahydrofurane (**THF**), sont fournis par Sigma Aldrich.

Symrise

Les lots 5 et 6 de xylanes de hêtre sont fournis par Symrise.

TAAB

L'acétate d'uranyle dibasique est fourni par TAAB.

VWR International

L'éthanol (96%, **EtOH**), l'acide sulfurique (95%), l'acétone, l'iodure de potassium, le thiosulfate de sodium, l'éthylène glycol, le nitrate de sodium et l'acide éthylène diamine tétraacétique (**EDTA**) sont fournis par VWR International.

Tous les réactifs sont utilisés sans purification supplémentaire. Les solvants utilisés sont de qualité 'réactif' sauf ceux utilisés pour la GC et HPLC qui sont de qualité chromatographique.

II. Spectroscopies

II.1. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Toutes les analyses (excepté la DOSY) sont réalisées à 298 K sur un appareil Bruker AVANCE I équipé d'une sonde directe 5 mm qui opère à 400.20 MHz et 100.63 MHz respectivement pour ^1H et ^{13}C . Les déplacements chimiques sont calibrés grâce au signal du TMS à 298 K. Les spectres sont ensuite traités par le logiciel Bruker Topspin.

II.1.1. Des xylanes et leurs dérivés

Pour chaque analyse RMN, 20 mg d'échantillon bien sec sont solubilisés dans 0,5 mL de D_2O (Eurisotop ; 99,9 atom%D). Les différents paramètres d'acquisition pour la RMN 1D sont résumés dans le Tableau 1.

Tableau 1. Paramètres d'acquisition RMN ^1H et ^{13}C pour les xylanes et dérivés des xylanes

	Impulsions (°)	Temps acquisition + relaxation (s)	Nombre de scans	Fenêtre spectrale (Hz)	Nombre de points
Proton	30	4 + 20	128	8 000	65 000
Carbone	30	1,5 + 2	4096	20 000	65 000

Les spectres obtenus par HSQC éditée (proton-detected Heteronuclear Single-Quantum Correlation) sont acquis sur une largeur spectrale de 20 000 Hz pour le carbone et 4000 Hz pour le proton avec 1024 points de données ; 256 incréments collectés et un délai entre deux impulsions de 1,5 s. L'acquisition est faite avec le programme d'impulsion *hsqcedetgpsisp2.3* de la base de données Bruker Topspin. La valeur de constante de couplage pour le transfert de polarisation correspond à la valeur moyenne $^1J_{C-H}$ de 145 Hz.

Pour les mesures de diffusion, des analyses de type DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy) sont réalisées à 298 K sur un spectromètre Bruker AVANCE III HD 400 équipé d'une crysonde Prodigy fonctionnant à 400.33 MHz. Cette sonde de 5 mm est capable de produire des gradients dans la direction z d'une force de 53,5 G.cm⁻¹. L'acquisition est faite avec le programme d'impulsion *ledbpgp2s* de la base de données Bruker Topspin. La force des gradients est linéairement incrémentée en 32 étapes de 5 % à 95 %. Les durées maximales du gradient de 1,5 ms et 100 ms, sont utilisées pour le temps de diffusion. Un temps de relaxation de 3 secondes entre deux impulsions est utilisé. Le traitement des données est effectué avec 8192 points dans la dimension F2 et 64 points dans la dimension F1 avec le logiciel Topspin. Sur la carte DOSY la première dimension (axe horizontal) correspond aux déplacements chimiques et la deuxième dimension (axe vertical), au coefficient de diffusion. Deux molécules de taille et de mobilité différentes, sont alors séparées sur la carte DOSY selon leur coefficient de diffusion D. La calibration du champ est réalisée à 25°C en utilisant le coefficient de diffusion du solvant: H₂O+D₂O à $19,0 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [1,2].

II.1.2. Des dérivés d'acide gras

Pour chaque analyse RMN, environ 20 mg du dérivé d'acide gras est solubilisé dans 0,5 mL de CDCl₃ (Eurisotop ; 99,5 atom%D). Les différents paramètres d'acquisition pour la RMN ¹H sont résumés dans le Tableau 2.

Tableau 2. Paramètres d'acquisition RMN ^1H pour les dérivés d'acide gras

	Impulsions (°)	Temps acquisition + relaxation (s)	Nombre de scans	Fenêtre spectrale (Hz)	Nombre de points
Proton	30	4 + 1	16	8 000	65 000

II.2. Spectrométrie d'absorption UV-Visible

Les spectres UV-visible sont enregistrés sur un spectromètre PERKIN ELMER (modèle Lambda 18) en utilisant des cuves en quartz de 10 mm d'épaisseur (100-QS, Hellma® Analytics).

II.3. Spectrométrie Infra-Rouge

Les spectres IR sont enregistrés sur un spectromètre FTIR Thermo Nicolet (modèle Avatar 370 FT-IR). Les spectres sont acquis en mode transmission à partir de pastilles KBr.

II.4. Désorption-ionisation laser assistée par matrice à analyseur à temps de vol (MALDI-TOF)

Les analyses de masse MALDI-TOF sont réalisées au CESAMO (ISM, Université de Bordeaux) sur un appareil Voyager (Applied Biosystems). L'appareil est équipé d'un laser pulsé N_2 (337 nm) et d'une source d'ionisation assistée par une matrice avec un analyseur à temps de vol. Les spectres sont enregistrés en mode positif grâce à un réflectron avec un voltage d'accélération de 20 kV. Les échantillons et la matrice acide 2,5-dihydroxybenzoïque (Fluka Chemika ; 2,5-DHB >98,5%) sont solubilisés dans l'eau à 10 g/L. Les solutions sont ensuite préparées à un ratio volumique matrice: échantillon de 10:1. Finalement, 1 à 2 μL de la solution sont déposés sur plaque qui est séchée sous vide.

II.5. Ionisation par électronébulisation (ESI)

Les analyses de masse ESI sont réalisées au CESAMO (ISM, Université de Bordeaux) sur un appareil QStar Elite (Applied Biosystems). Le spectromètre est équipé d'une source ESI et les spectres sont enregistrés en mode positif. L'aiguille pour l'électrospray est maintenue à 4500 V

et opère à température ambiante. Les échantillons sont introduits par injection par une boucle d'échantillonnage de 20 ml dans un flux de méthanol réglé à 400 mL/min.

III. Chromatographies

III.1. En phase liquide à haute performance (HPLC)

Les analyses HPLC sont réalisées à température ambiante sur un appareil Thermo équipé de colonnes Grace Prevail Carbohydrate ES 5 μm (250 mm x 4,6 mm) et d'un détecteur LT-ELSD (Sedere, Sedex 85), dont la nébulisation est réglée à 45°C (gain 8, filtre 8 secondes). Les analyses sont réalisées avec un gradient acétonitrile/eau (de 80 :20 à 75 :25 en 30 minutes) à un débit de 1 mL/min. Le volume d'injection est fixé à 10 μL .

III.2. En phase liquide flash (FC)

Les analyses FC sont réalisées sur un appareil Grace Reveleris® équipé de colonnes Grace Reveleris® Silica 40 μm (4 g) et de détecteurs ELSD et UV (254 et 280 nm). Les analyses sont réalisées avec un gradient DCM/méthanol (de 100 :0 pendant 5 minutes à 20 :80 en 2 minutes puis 20 :80 pendant 3 minutes). Le volume d'injection est fixé à 5 mL.

III.3. En phase gazeuse (GC)

III.3.1. GC-FID des xylanes

Pour les analyses en GC-FID, environ 2 μL de sucres acétylés sont injectés en mode 'splitless' dans l'appareil de GC (GC 8000, Fisons Instruments) équipé d'une colonne Rtx-2330 (Restek). Le programme du four utilisé est : 195°C pendant 4 min puis montée en température à 2,5°C/min jusqu'à 225°C puis maintien de la température pendant 2 min. Le gaz vecteur utilisé est l'azote. Les standards utilisés pour la calibration de la GC, *i.e.* glucose, xylose, arabinose, galactose, et mannose sont fournis par Fluka Chemika et le myo-inositol par Sigma Aldrich.

III.3.2. GC-FID des dérivés d'acide gras

Les analyses en GC des corps gras sont réalisées à l'ITERG sur un appareil Shimadzu (GC-2010 plus) équipé d'une colonne capillaire ZB-5HT (INFERNO, 15 m x 0,25 mm ID, 0,1 μ m d'épaisseur) et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID à 380°C). Un volume de 1 μ L est injecté en mode 'splitless' et le gaz vecteur utilisé est l'hydrogène (débit de 1,17 mL/min). Le programme utilisé est : 60°C pendant 3 min puis montée en température à 10°C/min jusqu'à 370°C et maintien de la température pendant 12 min.

Les échantillons bruts à analyser sont préalablement silylés par un mélange N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide/trimethylchlorosilane, dilués dans l'isooctane et injectés dans les conditions précédentes.

III.4. Par exclusion stérique (SEC)

III.4.1. SEC-RI des xylnes

- Caractérisation des MGX natifs (chapitre I) et optimisation des conditions d'hydrolyse (chapitre II) :

L'appareil (Spectra-Physics Analytical) est équipé de trois colonnes TSK gel G3000PW G4000PW G3000PW (TOSOH BIOSCIENCE) et d'un détecteur RI (model RID-10A, Shimadzu). La calibration est effectuée avec des standards de calibration pullulane (pullulanes fournis par Polymer Standards Service pour les masses molaires les plus faibles ($\bar{M}_w = 342-22800$ g/mol) et par Showa Denko pour les masses molaires les plus élevées ($\bar{M}_w = 5900-375000$ g/mol)). Les échantillons sont solubilisés dans l'éluent (H_2O , pH 12) à 6 g/L et le débit est réglé à 0,7 mL/min.

- Reproductibilité de l'hydrolyse (chapitre II) et chapitre III :

Le même appareil (Spectra-Physics Analytical) est équipé de deux colonnes TSK gel G3000PW G2000PW (TOSOH BIOSCIENCE) avec le détecteur RI (model RID-10A, Shimadzu). La calibration est effectuée avec les mêmes standards de calibration pullulane. Les échantillons sont cette fois-ci solubilisés dans un tampon phosphate ($NaNO_3$ 0,2M, Na_2HPO_4 0,01M, pH 9) à 6 g/L et le débit est réglé à 0,5 mL/min.

III.4.2. SEC-RI/MALLS des xylanes

L'appareil (PU-980, Jasco) est équipé de trois colonnes PL aquagel-OH (aquagel-OH guard 8 μ m, aquagel-OH 30 8 μ m, aquagel-OH 40 8 μ m) fournies par Polymer Laboratories. Les détecteurs utilisés sont un détecteur RI (Optilab rEX, Wyatt Technology) et un détecteur par diffusion de la lumière laser multi angles (**MALLS**) (658 nm, DAWN HELEOS-II, Wyatt Technology). Les échantillons sont solubilisés dans un tampon phosphate (NaNO₃ 0,2M, Na₂HPO₄ 0,01M, pH 9) à 6 g/L et le débit est réglé à 0,6 mL/min.

Les équations impliquées en diffusion de la lumière font apparaître un incrément spécifique d'indice de réfraction, dn/dc , qui dépend de l'espèce analysée et du solvant. Ce dernier a été déterminé expérimentalement pour les MGX en tampon phosphate, en utilisant une gamme de concentrations allant de 1 à 10 g/L, au moyen d'un réfractomètre différentiel (Optilab rEX, Wyatt Technology) opérant à 658 nm et à 25 °C.

III.4.3. SEC-RI/UV des dérivés d'acide gras

L'appareil (PL-GPC 50, Polymer laboratories – Varian) possède un détecteur RI intégré et est équipé de quatre colonnes TSK gel HXL-L (guard column, 6.0 mm ID x 4.0 cm L) G4000HXL (7.8 mm ID x 30.0 cm L) G3000HXL (7.8 mm ID x 30.0 cm L) G2000HXL (7.8 mm ID x 30.0 cm L) de chez TOSOH BIOSCIENCE ainsi que d'un détecteur UV (K-2501, Knauer). Les échantillons sont solubilisés dans le THF (avec 0,2 vol.% de 1,2,4-trichlorobenzène, Sigma Aldrich, comme marqueur de débit) à 10 g/L et le débit est réglé à 1 mL/min (THF comme éluant). L'analyse est réalisée à 40 °C. La calibration est effectuée avec des polystyrènes sulfonés (EasiVial PS-M 2mL tri-pack, Agilent technologies).

IV. Analyses thermiques

IV.1. Analyse thermogravimétrique (TGA)

Les analyses TGA sont réalisées sur un appareil TGA-Q50 (TA Instruments) de 30 à 800°C à une vitesse de 10°C/min sous atmosphère inerte (azote). Pour le xylane natif (chapitre I) et les XOS (chapitre II), en fin de montée, à 800 °C, le gaz vecteur inerte est changé pour passer sous oxygène et obtenir le taux de cendres.

IV.2. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

Les analyses DSC sont réalisées sur un appareil Q100 (TA Instruments). Pour chaque échantillon, deux montées et une descente en température ont été réalisées à 10°C/min. Les températures de transition vitreuse et/ou de fusion ont été calculées à partir du thermogramme obtenu lors de la seconde montée. Tous les échantillons ont été analysés entre -80°C et 130°C pour s'assurer de la non-dégradation de la partie xylane.

V. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Les analyses en DLS sont réalisées sur un appareil Malvern Nano ZS ZetaSizer équipé d'un laser HeNe standard à 632,8 nm. Les mesures sont effectuées à 25°C, sous un angle de 90°. Les tailles des particules ainsi que les distributions en taille sont déterminées par la méthode des cumulants (second ordre).

VI. Microscopie électronique en transmission (TEM)

Les images TEM sont acquises au BIC (Bordeaux Imaging Center) sur un microscope FEI TECNAI 12 travaillant à 120kV et équipé d'une caméra GATAN Orius 11 MP. Les échantillons sont préparés par dépôt direct d'une goutte de solution à 1 g/L sur des grilles en carbone (maille de 200). Pour le chloroforme, la goutte est laissée sécher entièrement alors que pour l'eau, le reste de liquide est enlevé par absorption sur papier filtre après 1 minute 30. Après séchage, une goutte de solution d'acétate d'uranyle (pureté, fournisseur) dans l'eau (10 g/L) a été déposée. Après 1 minute 30, le reste de liquide est enlevé par absorption sur papier filtre.

VII. Fluorimètre

Les mesures d'intensité de fluorescence du pyrène sont réalisées sur un fluorimètre Fluoromax-4 (Horiba Scientific). Les solutions aqueuses étudiées, contenant du pyrène, sont excitées à 334 nm et le spectre d'émission est enregistré entre 365-400 nm avec un point tous les 0,5 nm. Les ouvertures de fente sont résumées dans le Tableau 3.

Tableau 3. Réglages des ouvertures de fente du fluorimètre

	Entrée (nm)	Sortie (nm)
Excitation	3,0	3,0
Emission	1,5	1,5

VIII. Goniomètre

Les mesures de tension de surface et d'angles de contact sont réalisées sur un goniomètre Krüss DSA100 équipé d'une caméra (J1H High Speed Camera) munie d'un capteur CCD type 8420. Le logiciel Drop Shape Analysis V.1.90.1.14 est utilisé pour traiter les données.

Partie B.

Modes opératoires

I. Chapitre I

I.1. Ultrafiltration

Une solution de xylanes à 50 g/L est préparée la veille pour s'assurer que les xylanes soient bien solubilisés. La solution est gardée la nuit sous agitation magnétique.

L'ultrafiltration est ensuite réalisée par filtration tangentielle avec le système de filtration Tandem 1082, de Sartorius Stedim Biotech. La première membrane utilisée est une membrane hydrosart 0,45 μm (Sartocon Slice 200, 3081860602W—SW, Sartorius Stedim Biotech). La solution est récupérée, puis filtrée par une membrane polyéthersulfone de 300 kDa (Sartocon Slice 200, 3081467902E—SW, Sartorius Stedim Biotech). En fin de filtration, les perméat et rétentat sont récupérés (Figure 1), pesés, et séchés.

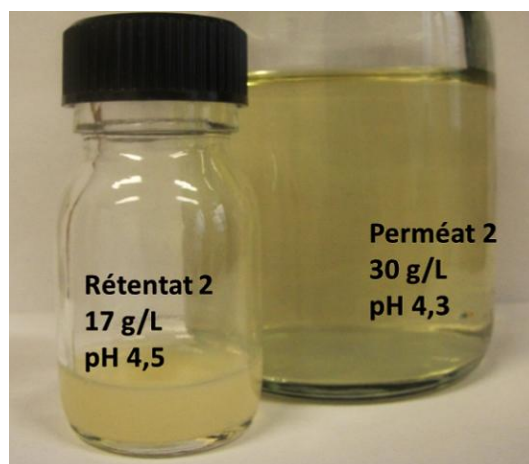


Figure 1. Photo illustrant les rétentat et perméat après passage sur la deuxième membrane à 300 kDa

I.2. Hydrolyse totale

Les xylanes sont hydrolysés selon un protocole adapté de la norme Tappi T249 cm-85 [3]. Le xylane (1 g) est solubilisé dans 10 mL d'acide sulfurique concentré (72%) et gardé à température ambiante sous agitation magnétique pendant 4 heures. Ensuite 300 mL d'eau distillée sont ajoutés et le mélange est chauffé à reflux pendant 4 heures supplémentaires. Le mélange est alors laissé au repos pour son refroidissement puis filtré sur un verre fritté n°4. Le filtrat est

neutralisé par une solution d'hydroxyde de baryum saturée et la solution est centrifugée pour précipiter BaSO_4 (à 2600 g soit 4500 rpm, pendant 10 min à 10°C; modèle CR4-12, Jouan). Le surnageant est alors récupéré et lyophilisé.

I.3. Acétylation

Une fois secs, les monomères obtenus par hydrolyse totale sont solubilisés dans l'eau distillée à 5 g/L. Une solution (40 μL) de myo-inositol dans l'eau à 11,3 g/L est ajoutée à 200 μL de cette solution sont ajoutés à 40 μL . Puis, 1 mL d'une solution de NaBH_4 dans le DMSO à 20 g/L est finalement ajouté et le mélange est agité pendant 90 minutes à 40°C. Puis, 210 μL d'acide acétique, 2 mL d'anhydride acétique et 200 μL de 1-méthylimidazole sont ajoutés et le tout est agité encore 10 minutes. Finalement 5 mL d'eau distillée sont ajoutés [4]. Les monomères acétylés sont ensuite extraits par 2 mL de dichlorométhane, et directement injectés en GC.

II. Chapitre II

II.1. Synthèse des XOS

Les xylanes (500 mg ou 1 g) sont solubilisés dans 10 mL d'une solution diluée d'acide sulfurique (entre 0,2-2,0 M selon les expériences). La solution est placée à agiter à température modérée (70-90°C) et pour un certain temps qui varie en fonction de l'expérience (entre 10 et 420 minutes). La solution est mise à refroidir dans un bain de glace puis neutralisée avec une solution d'hydroxyde de baryum saturée. Après centrifugation (2600 g, 4500 rpm, 10 min, 10°C; modèle CR4-12, Jouan), pour enlever le sulfate de baryum, le surnageant est lyophilisé. Les conditions utilisées pour l'étude de l'hydrolyse ont été inspirées de la littérature [5–8].

Pour purifier les XOS, le lyophilisat est remis en solution dans l'eau à 100 g/L et de l'éthanol est ajouté au milieu pour atteindre 90 vol.% d'éthanol dans la solution finale [9,10]. La solution est laissée sous agitation magnétique environ 20h puis centrifugée (2600 g, 4500 rpm, 15 min, 5°C; modèle CR4-12, Jouan). Le précipité est récupéré et la purification est répétée à l'identique. Finalement, le précipité est séché sous vide. La concentration de la solution initiale dans l'eau

ainsi que la fraction volumique d'éthanol ont été modifiées pour optimiser la purification (chapitre II.B.II).

II.2. Dosage du furfural

La concentration en furfural est estimée par la mesure de l'absorbance à 277 nm à l'aide d'un spectromètre UV tel que le décrit la norme NF T 12-008 [11]. Une courbe de calibration est mise au point pour des solutions de furfural avec des concentrations allant de 4,0 à 12,0 µg/mL. Brièvement, 110 mg du produit d'hydrolyse est dissous dans 2mL d'eau déionisée pour atteindre une concentration comprise dans la gamme de la calibration.

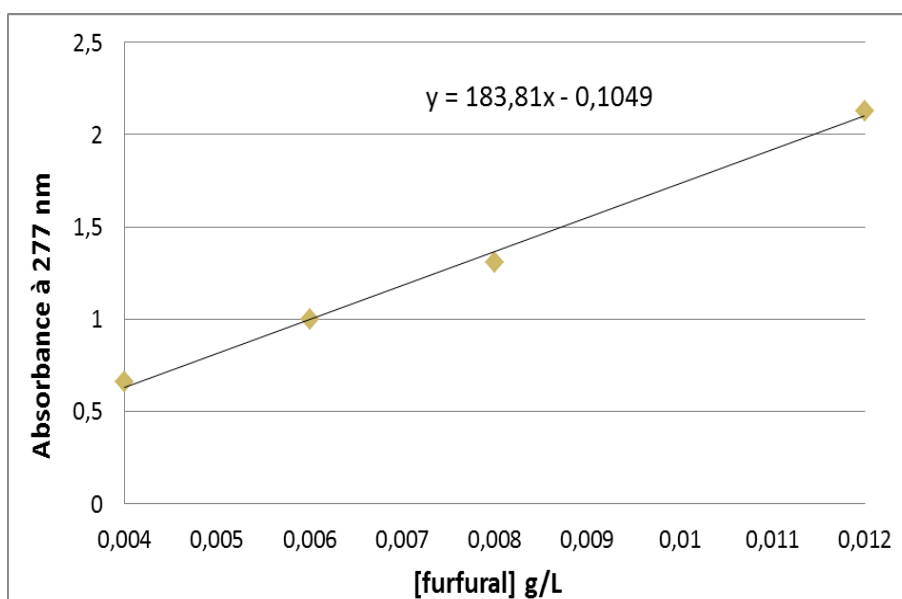


Figure 2. Courbe de calibration pour la détermination de la quantité de furfural

II.3. Réaction de peeling

Les XOS sont solubilisés dans une solution d'hydroxyde de sodium (18%) à une concentration de 6 g/L. La réaction est réalisée sous agitation magnétique à 43°C pendant 420 minutes [12], puis neutralisée par de l'acide chlorhydrique diluée à 0,6 M pour finalement être lyophilisée.

III. Chapitre III

III.1. Oxydation au periodate de sodium

L'oxydation au periodate des xylanes est effectuée selon une méthode adaptée de Gomez *et al.* (2007) [13]. Le xylane ultrafiltré (250 mg) est dissous dans 15 mL d'eau distillée, puis sont alors ajoutés 2,5 mL de solution de periodate de sodium. Des concentrations en periodate allant de 0,03 M à 0,59 M sont utilisées afin d'atteindre un taux de periodate de 5, 20 ou 100 mol.% par rapport aux unités xylose. De l'eau déionisée est ensuite ajoutée jusqu'à ce que la solution atteigne un volume total de 25 mL. La solution est agitée dans le noir pendant 6h dans un bain thermostaté à 25°C. Le periodate n'ayant pas réagi est alors détruit avec 250 µL d'éthylène glycol. Des fractions de solution sont collectées périodiquement pour suivre la consommation du periodate.

Le xylane oxydé est ensuite purifié par précipitation. Le produit est précipité par l'addition de 38 mg de chlorure de sodium et de 63 mL d'éthanol. Le précipité est collecté par centrifugation, puis re-dissous dans 13 mL d'eau déionisée. Du NaCl (25 mg) et de l'éthanol (38 mL) sont ajoutés, et la solution est centrifugée. Le procédé est finalement répété en utilisant 25 mg de NaCl et 25 mL d'acétone. Le précipité est lavé dans 13 mL d'éthanol sous agitation pendant 20 minutes, centrifugé, et séché sous vide à température ambiante.

Le protocole est adapté lors des études de la température et de la concentration en xylane, ainsi que lors de l'oxydation des oligomères de xylane (chapitre III.A.II et III).

III.2. Suivi de la consommation du periodate

III.2.1. Titrage iodométrique

À 1 mL d'aliquot sont ajoutés 5 mL d'une solution d'iodure de potassium (0,2 g/mL) et trois gouttes d'acide sulfurique concentré (95%). Le diiode généré est ensuite titré avec une solution standard de thiosulfate de sodium, en employant le thiodène comme indicateur coloré. La même procédure est répétée sur une fraction d'1 mL de solution quenchée avec 1 mL d'éthylène glycol. La quantité de periodate de sodium consommée est donnée par [14]: $n_{\text{diiode}} - n_{\text{diiode (quenchée)}}$, où n est le nombre de moles.

III.2.2. Suivi par absorbance

La concentration en periodate de sodium est directement estimée par mesure de l'absorbance à 225 nm [15] avec un spectromètre UV Lambda 18 (Perkin Elmer). Une courbe de calibration est préalablement construite à partir de solution de periodate de concentrations allant de $1,0 \cdot 10^{-5}$ M à $2,5 \cdot 10^{-4}$ M (Figure 3). Des fractions de la solution sont collectées à des temps précis puis diluées pour atteindre une valeur de concentration comprise dans la gamme de calibration. La solution est placée dans une cellule de quartz de 3 mL.

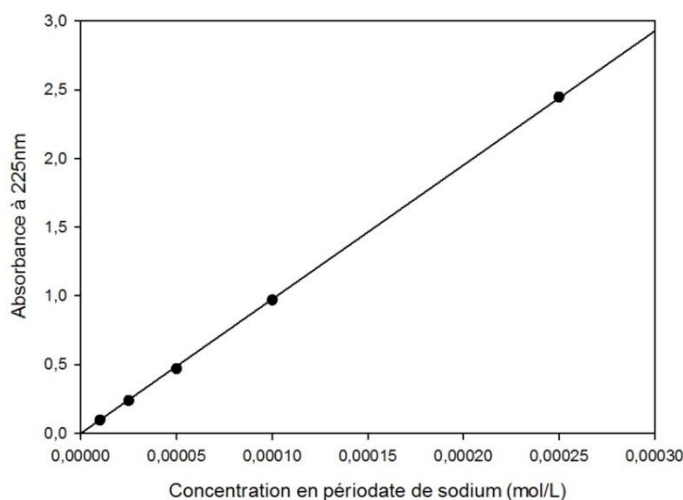


Figure 3. Courbe de calibration pour la méthode spectrométrique à 225 nm

III.3. Titrage des aldéhydes à l'hydroxylamine chlorhydrate

La détermination du nombre d'aldéhyde peut être réalisée selon la méthode de l'hydroxylamine chlorhydrate [16]. Les xylanes oxydés (30 mg) sont dissous dans 25 mL d'une solution d'hydroxylamine chlorhydrate à 0,25 M. La solution est agitée à 50°C pendant 6 heures. Le mélange est ensuite titré à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium 0,01 M par suivi pH métrique. Le volume équivalent est alors estimé grâce aux calculs des dérivées premières (maximum) et seconde (valeur nulle). Le degré d'oxydation est alors donné par la relation :

$$DO = \frac{n \text{ xylose oxydé} - n \text{ aldéhyde extrémité réductrice}}{n \text{ xylose initial}}$$

$$\text{avec: } n \text{ xylose oxydé} = \frac{n \text{ aldéhyde total}}{2} = \frac{n \text{ HCl}}{2} = \frac{V_{eq} * [NaOH]}{2}$$

$$\text{et: } n \text{ aldéhyde extrémité réductrice} = \frac{m \text{ introduite}}{DP * (M \text{ anhydroxylose} + \frac{1}{x} M \text{ acide glucuronique})}$$

avec x : le nombre d'unités xylose pour un MeGlcA, soit 10 pour les xylanes du lot 4, 8 pour les xylanes du lot 6 et 4 pour les oligomères,

$$\text{et: } n \text{ xylose initial} = \frac{m \text{ introduite}}{M \text{ anhydroxylose} + \frac{1}{x} M \text{ acide glucuronique}}$$

III.4. Synthèse de l'azoture d'aminoéthyle

L'azoture d'aminoéthyle n'étant pas disponible commercialement, il est synthétisé par substitution nucléophile de l'azoture de sodium sur le 2-chloroéthylamine hydrochlorate [17]. L'hydrochlorate est solubilisé dans l'eau (133 g/L) à 80°C puis 3 équivalents d'azoture sont ajoutés au mélange laissé sous agitation à 80°C sous reflux pour la nuit. Le mélange est ensuite ramené à température ambiante puis à 0°C par l'utilisation d'un bain de glace. De l'hydroxyde de potassium (masse identique à celle de chlorate utilisée) est ajouté. Après totale dissolution des sels, l'azoture d'aminoéthyle est récupéré par extraction au diéthyléther. La phase organique est ensuite récupérée, séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée pour récupérer l'azoture (rendement d'environ 20 mol.%).

III.5. Amination réductrice

Les xylanes et oligomères oxydés sont solubilisés dans de l'eau déionisée à 10 g/L. Pour les oligomères non oxydés, ils sont préparés à 100 g/L au regard de leur meilleure solubilité dans l'eau. L'amine (benzylamine, azoture d'aminoéthyle ou allylamine à 7,5 équivalents) est ajouté, suivie par l'addition de cyanoborohydrure de sodium (NaBH_3CN , 7,5 équivalents). La solution est agitée à 50°C pendant 3 jours. Le mélange est ensuite purifié par trois précipitations à l'éthanol (1 :10) successives. Une fois centrifugé, le produit est séché sous vide à température ambiante. Le protocole a été optimisé d'après celui utilisé au laboratoire [18].

IV. Chapitre IV

IV.1. Réaction de thiol-ène

Les esters gras (MeOl ou MeRic) sont solubilisés dans le méthanol à 50 g/L. L'éthanedithiol (5, 10 ou 20 équivalents) est ajouté au mélange sous agitation magnétique, suivi de la DMPA (0,1 équivalent). Le tout est laissé agiter 15 minutes dans le réacteur UV (365 nm, UV-F400, Panacol-Elosol). La solution est séchée sous vide puis le mélange est purifié par chromatographie flash (rendement de 88 %).

IV.2. Réaction de transestérification

Les esters gras (MeOl ou MeRic) sont mis à réagir en masse avec le butynol (10 équivalents) et le catalyseur (TBD, 0,1 équivalent). Le mélange est placé à 100°C sous agitation magnétique et sous atmosphère inerte (flux d'azote) pendant 4h. Le mélange est ensuite placé sous vide dynamique puis laissé à 100°C pour 4h de plus. Il est ensuite purifié par extraction liquide/liquide (éthyle acétate/eau, 4:1). La phase organique est finalement séchée sur Na₂SO₄, filtrée puis séchée (rendement de 75 %).

IV.3. Couplage thiol-ène

Il s'agit du protocole final, après optimisation des conditions détaillées dans le chapitre IV.B.1). Les XOS fonctionnalisés par le groupement allyle sont mis en solution à agiter dans le méthanol à 50 g/L la veille. Le mélange est placé dans le réacteur UV (365 nm, UV-F400, Panacol-Elosol) et les esters gras fonctionnalisés thiol (15 équivalents) ainsi que le catalyseur (DMPA, 0,75 équivalent) sont ajoutés au mélange en 5 fois toutes les heures. Le mélange est agité dans le réacteur UV 19h de plus. La solution est séchée sous vide, le produit est ensuite lavé à l'éthanol (2X) puis au cyclohexane (72 % de rendement).

IV.4. Couplage azoture-alcyne

Les XOS fonctionnalisés par un groupement azoture sont mis en solution à agiter dans le DMSO à 100 g/L à 30°C la veille. Les esters gras fonctionnalisés alcyne (1 équivalent) sont mélangés à un volume minimum de DMSO puis ajoutés au mélange. Après 15 min, le sodium ascorbate (3,5 équivalents) est ajouté suivi du CuSO₄ (3,5 équivalents) 10 min après. La solution est laissée agiter pendant 20-25 heures à 30°C. Le mélange est ensuite dialysé (MWCO : 100-500 D,

Spectra/Por®Biotech) 4-5 jours dans l'eau, avec de l'EDTA les deux premiers jours, puis lyophilisé ($\approx 30\%$ de rendement).

V. Chapitre V

V.1. Détermination de la CMC par fluorimétrie

Les solutions de tensioactifs en présence de pyrène sont préparées comme suit. Tout d'abord une solution de pyrène dans l'éthanol à $5 \cdot 10^{-2}$ M ($M_{\text{pyrène}}=202,25$ g/mol) est préparée en agitant la solution au moins 24 heures à l'abri de la lumière. La solution mère eau/éthanol, pyrène à $1 \cdot 10^{-3}$ M (10 μ L de la solution dans l'éthanol ajoutée à 490 mL d'eau déminéralisée) est ensuite préparée, toujours à l'abri de la lumière, en agitant au moins 48 heures de plus. Enfin, les solutions de concentration voulue sont obtenues par simple dilution en agitant au moins 48 heures de plus à l'abri de la lumière. Les spectres d'émission de fluorescence du pyrène sont enregistrés à différentes concentrations à l'aide d'un fluorimètre (voir Partie A-VII) et le rapport I_I/I_{III} peut être mesuré.

V.2. Mesure des tensions de surface

Des solutions aqueuses de Tween® 80 et XOS-AA-Ric sont préparées par dilution d'une solution mère à 10 g/L. Les solutions sont agitées au moins une nuit pour que l'équilibre soit atteint.

Les mesures de tension de surface sont réalisées par la méthode de la goutte pendante. La goutte est obtenue par une micro seringue équipée d'une aiguille de diamètre 1,8 mm (Krüss NE45), directement fixée au goniomètre. Le goniomètre, équipé d'une caméra, permet de prendre un cliché au moment où la goutte est sur le point de tomber, puis la goutte est analysée à l'aide du logiciel 'Drop Shape Analysis v.1.90.1.14'. L'opérateur décide du meilleur moment pour prendre le cliché.

Les mesures sont réalisées au moins cinq fois afin de s'affranchir d'éventuelles erreurs d'observation. Pour s'assurer de la répétabilité de la mesure, certains points choisis aléatoirement sont refaits à plusieurs jours d'écart.

V.3. Mesure des angles de contact

Des solutions aqueuses de Tween® 80 et de XOS-AA-Ric à différentes concentrations ont été préparées par dilution d'une solution mère à 10 g/L. Les solutions sont agitées au moins une nuit pour que l'équilibre soit atteint.

Les mesures d'angles de contact sont réalisées sur le goniomètre sur lequel une micro seringue équipée d'une aiguille de diamètre 0,5 mm (Krüss NE44) est fixée. Une goutte de 5 µL de la solution est alors déposée sur le substrat et la caméra permet de filmer la goutte. Les angles de contacts, entre le liquide et le substrat, sont alors calculés par le logiciel 'Drop Shape Analysis v.1.90.1.14'. Quatre types de substrats ont été choisis :

- lames de verre de microscope
- PET, découpé en salle blanche, ne présentant aucun défaut de surface
- ruban adhésif « Invisible Tape – 184.835 » de la marque LYRECO
- PTFE norme BS 7786 :1995 grade L, préalablement fixé sur des lames de verre, lavé à l'acétone puis séché à l'air libre dans le but de garantir la propreté de la surface

Le choix s'est fait selon trois critères : l'hydrophobie du substrat, sa simplicité d'utilisation et sa disponibilité.

Au moins cinq mesures ont été réalisées pour chaque point afin de s'affranchir d'éventuelles erreurs d'appréciation de la part de l'opérateur ou de défauts de surface ponctuels invisibles à l'écran.

V.4. Test de Ross-Miles

Le test de Ross-Miles est un test dérivé de la norme ASTM D1173-53 [19]. Ce protocole est adapté aux quantités disponibles. Ainsi, 100 mL d'une solution aqueuse de Tween® 80 et de XOS-AA-Ric à 0,1% massique sont versés dans 25 mL de cette même solution d'une hauteur de 45 cm. La hauteur de mousse formée est ensuite suivie au cours du temps. La stabilité de mousse correspond au rapport entre la hauteur de mousse au temps t et la hauteur au temps initial.

Références

- [1] Holz M, Weingartner H. Calibration in accurate spin-echo self-diffusion measurements using ^1H and less-common nuclei. *J Magn Reson* 1991;92:115–25.
- [2] Longworth LG. THE MUTUAL DIFFUSION OF LIGHT AND HEAVY WATER. *J Phys Chem* 1960;64:1914–7. doi:10.1021/j100841a027.
- [3] Tappi method T249 cm-85. Carbohydrate composition of extractive-free wood and wood pulp by gas-liquid chromatography. Tappi Press 1997.
- [4] Blakeney AB, Harris PJ, Henry RJ, Stone BA. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydr Res* 1983;113:291–9.
- [5] Kumar R, Wyman CE. The impact of dilute sulfuric acid on the selectivity of xylooligomer depolymerization to monomers. *Carbohydr Res* 2008;343:290–300.
- [6] Sun H-J, Yoshida S, Park N-H, Kusakabe I. Preparation of (1→4)- β -d-xylooligosaccharides from an acid hydrolysate of cotton-seed xylan: suitability of cotton-seed xylan as a starting material for the preparation of (1→4)- β -d-xylooligosaccharides. *Carbohydr Res* 2002;337:657–61.
- [7] Akpinar O, Erdogan K, Bostanci S. Production of xylooligosaccharides by controlled acid hydrolysis of lignocellulosic materials. *Carbohydr Res* 2009;344:660–6.
- [8] González G, López-Santín J, Caminal G, Solà C, Gonzalez G, J. L-S, et al. Dilute Acid Hydrolysis of Wheat Straw Hemicellulose at Moderate Temperature: A Simplified Kinetic Model. *Biotechnol Bioeng* 1986;XXVIII:288–93.
- [9] Vázquez MJ, Garrote G, Alonso JL, Domínguez H, Parajó JC. Refining of autohydrolysis liquors for manufacturing xylooligosaccharides: evaluation of operational strategies. *Bioresour Technol* 2005;96:889–96.
- [10] Moure A, Gullón P, Domínguez H, Parajó JC. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. *Process Biochem* 2006;41:1913–23.
- [11] AFNOR standard NF T 12-008. Determination of pentosan content. *Pulps* 1987.
- [12] Sartori J, Potthast A, Rosenau T, Hofinger A, Sixta H, Kosma P. Alkaline degradation of model compound related to beech xylan. *Holzforschung* 2004;58:588–96.
- [13] Gomez CG, Rinaudo M, Villar MA. Oxidation of sodium alginate and characterization of the oxidized derivatives. *Carbohydr Polym* 2007;67:296–304.

- [14] Babor K, Kalac V, Tihlarik K. Periodate oxidation of saccharides . III . * Comparison of the methods for determining the consumption of sodium periodate and the amount of formic acid formed 1973;27:676–80.
- [15] Fredon E, Granet R, Zerrouki R, Krausz P, Saulnier L, Thibault JF, et al. Hydrophobic films from maize bran hemicelluloses. *Carbohydr Polym* 2002;49:1–12.
- [16] Zhao H, Heindel ND. Determination of degree of substitution of formyl groups in polyaldehyde dextran by the hydroxylamine hydrochloride method. *Pharm Res* 1991;8:400–2.
- [17] Huynh N-T, Jeon Y-S, Zrinyi M, Kim J-H. Preparation of “click” hydrogels from polyaspartamide derivatives. *Polym Int* 2013;62:266–72. doi:10.1002/pi.4295.
- [18] Schatz C, Louguet S, Le Meins J-F, Lecommandoux S. Polysaccharide-block-polypeptide Copolymer Vesicles: Towards Synthetic Viral Capsids. *Angew Chemie Int Ed* 2009;48:2572–5.
- [19] ASTM D1173-53. Standard test method for foaming properties of surface-active agents. *ASTM Int* 2001.

